

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА»

На правах рукописи

КАНАЕВА
Ольга Ильинична

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Бичурина Маина Александровна

Москва

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	14
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Энтеровирусы, строение и характеристика.....	14
1.1.1. Таксономия энтеровирусов.....	14
1.1.2. Строение вириона и жизненный цикл энтеровирусов.....	17
1.1.3. Изменчивость генома энтеровирусов.....	20
1.2. Роль энтеровирусов в инфекционной патологии.....	22
1.3. Лабораторная диагностика энтеровирусной инфекции.....	29
1.3.1. Вирусологический метод диагностики.....	30
1.3.2. Молекулярно-биологический метод диагностики.....	32
Заключение.....	35
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Материалы исследования.....	37
2.2. Методы исследования.....	41
2.2.1. Вирусологический метод исследования.....	41
2.2.2. Молекулярно-биологический метод исследования.....	43
2.2.3. Филогенетический анализ.....	46
2.2.4. Статистическая обработка данных.....	46
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
ГЛАВА III. ПОЛИОВИРУСЫ И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА И КОНТАКТНЫХ ЛИЦ.....	47
ГЛАВА IV. НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ БОЛЬНЫХ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ.....	55
4.1. Результаты вирусологического исследования проб фекалий от больных энтеровирусной инфекцией.....	55
4.2. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией на территориях, курируемых СПб РЦ.....	64
4.3. Периодические подъёмы и групповые заболевания энтеровирусной инфекцией с различными клиническими формами на территориях СПб РЦ.....	70
4.4. Молекулярно-генетический анализ энтеровирусов, выделенных во время периодических подъёмов и групповых заболеваний энтеровирусной инфекцией на территориях СПб РЦ.....	73

4.4.1. Энтеновирусы серотипов ЕСНО, вызвавшие подьёмы заболеваемости энтеровирусным менингитом.....	73
4.4.2. Энтеновирусы Coxsackievirus А, вызывающие энтеровирусную экзантему полости рта и конечностей.....	79
4.4.3. Энтеновирусы Coxsackievirus В, вызвавшие спорадические случаи энтеровирусного менингита.....	84
ГЛАВА V. НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ ДЕТЕЙ ИЗ ГРУПП РИСКА.....	89
5.1. Энтеновирусы, выделенные от детей из домов ребёнка.....	89
5.2.Энтеновирусы, выделенные от детей из детских коллективов.....	91
5.3. Энтеновирусы, выделенные от детей из семей мигрантов.....	93
5.4. Филогенетический анализ энтеровирусов, выделенных от детей из групп риска.....	99
ГЛАВА VI. ВЫДЕЛЕНИЕ ЭНТЕРОВИРУСОВ ИЗ ПРОБ СТОЧНОЙ ВОДЫ	103
6.1. Результаты вирусологического исследования проб, взятых из объектов окружающей среды на территориях СПб РЦ.....	103
6.2. Сравнение спектра энтеровирусов, выделенных от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды на территориях СПб РЦ.....	109
ОБСУЖДЕНИЕ.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
ВЫВОДЫ.....	126
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ

Энтеровирусы (ЭВ) являются одними из широко распространённых возбудителей инфекционных заболеваний человека. В большинстве случаев инфицирование не влечёт за собой заболевание, но при развитии заболевания наблюдается широкое разнообразие клинических форм энтеровирусной инфекции. Клинические формы с поражением центральной нервной системы, такие как параличи, менингит и менингоэнцефалит характеризуются тяжелой степенью тяжести. В редких случаях заболевания заканчиваются летальным исходом. Здоровые носители могут передавать вирус другим восприимчивым людям. Поскольку энтеровирусы одного и того же типа могут быть причиной заболеваний с разной клинической формой, а вирусы разных типов способны обусловить развитие одних и тех же клинических форм энтеровирусной инфекции, постановка диагноза может быть затруднена. Наряду с манифестными формами инфекции довольно широко распространено бессимптомное носительство энтеровирусов. Здоровые носители могут передавать вирус другим восприимчивым людям. При заносе энтеровирусов в детские коллективы возможно возникновение групповых заболеваний энтеровирусной инфекцией.

Актуальность темы исследования

В настоящее время известно более ста типов неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) [178], которые вызывают заболевания ЭВИ с разной клинической картиной. Для энтеровирусов (ЭВ) характерна изменчивость, в первую очередь, связанная с высокой частотой нуклеотидных замен в геноме вируса. Важную роль при образовании новых вариантов энтеровирусов также играет процесс рекомбинации, когда два вируса обмениваются участками генетического материала [67]. В результате получаются гибридные формы вирусов, совмещающие признаки обоих родительских штаммов.

Основной путь передачи энтеровирусов – контактно-бытовой, меньшую роль играют водный и пищевой пути передачи. ЭВ способны длительно сохраняться в сточной воде, попадая туда с фекалиями. При попадании сточных вод в открытые

водоёмы, использующиеся для забора питьевой воды или для купания, возможно возникновение групповых случаев энтеровирусной инфекции. Поэтому при проведении надзора за энтеровирусной инфекцией, в том числе осуществляется мониторинг сточных вод на наличие энтеровирусов [35, 65].

На территории нашей страны наблюдаются периодические подъёмы заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) в летне-осенний период. Спорадические случаи энтеровирусного менингита (ЭВМ) регистрируются в течение всего года. Хотя ЭВИ чаще имеют лёгкое течение, в силу своей распространённости они наносят значительный социально-экономический ущерб [23]. В современных условиях мобильности населения и усиливающегося процесса миграции энтеровирусы легко распространяются на новые территории. Были описаны случаи импортирования диких полиовирусов из неблагополучных по полиомиелиту территорий в свободные от полиомиелита страны [8, 19, 149]. Аналогичная ситуация происходит и с энтеровирусами. Происходили заносы в Россию энтеровирусов новых типов и генотипов, которые ранее не циркулировали на ее территориях [12, 15, 51, 59]. Рядом авторов было показано, что инфицированность трудовых мигрантов из Таджикистана возбудителями различных инфекционных заболеваний выше, чем у населения Российской Федерации [21]. Практически не существует публикаций, отражающих ситуацию по энтеровирусной инфекции и характеристику энтеровирусов в странах Средней Азии, из которых происходит активный приток трудовых мигрантов с семьями на территорию Российской Федерации.

Опасность также представляет занос энтеровирусов в закрытые детские коллективы и их скрытая циркуляция. В 2006 году было прекращено использование оральной полиовирусной вакцины в домах ребёнка, поскольку в этих учреждениях передача вакцинных полиовирусов, в том числе генетически изменённых по сравнению с оригинальными вакцинными штаммами, от недавно привитых детей не привитым осуществляется легко, высок риск развития вакциноассоциированного полиомиелита среди детей этой категории [42]. В отсутствии полиовирусов в этих учреждениях неполиомиелитные энтеровирусы

могут циркулировать более интенсивно и при постоянном контакте между детьми могут служить причиной возникновения заболеваний ЭВИ [7, 50].

Лабораторная диагностика ЭВИ осуществляется вирусологическим и молекулярно-биологическим методами. Выделение и идентификация энтеровирусов проводится классическим вирусологическим методом на культурах клеток. Ввиду большого числа ЭВ, определение типа энтеровируса в реакции нейтрализации с помощью специфических диагностических сывороток является трудоёмким и длительным процессом, результат которого не всегда точен. Поэтому для детекции и последующей идентификации ЭВ применяют молекулярно-биологические методы: полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование генома [26, 156, 157]. Секвенирование генома позволяет определить не только тип, но и генотип энтеровируса, что бывает важно при расшифровке вспышек и групповых заболеваний энтеровирусной инфекцией, установить филогенетические связи и географическое происхождение штаммов энтеровирусов.

Поиск и идентификация энтеровирусов, обнаруженных у разных категорий обследованных лиц и в объектах окружающей среды, а также изучение молекулярно-генетических особенностей энтеровирусов, циркулирующих в течение длительного периода на 14 территориях (в дальнейшем - регион), курируемых Санкт-Петербургским Региональным центром по надзору за полиомиелитом и острыми вялыми параличами (ОВП) является актуальной научной задачей.

Степень разработанности темы

В процессе реализации Программы ликвидации полиомиелита в неё были включены дополнительные виды надзора, такие как надзор за энтеровирусной инфекцией и за объектами окружающей среды. После сертификации в 2002 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) Российской Федерации (РФ) как территории, свободной от полиомиелита, возникла необходимость усиления надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами (ОВП). Эффективный надзор за энтеровирусной инфекцией дает дополнительные возможности для

выявления циркуляции полиовирусов среди населения и их выявления в объектах окружающей среды [48]. Шесть Региональных центров РФ по надзору за полиомиелитом и острыми вялыми параличами, в том числе Региональный центр в Санкт-Петербурге, осуществляют контроль работы вирусологических лабораторий на территориях и оказывают научно-методическую помощь учреждениям Роспотребнадзора.

Вирусологический мониторинг циркуляции энтеровирусов на административных территориях России невозможен без сочетания вирусологического и молекулярного методов исследования. Использование таких методов как ПЦР, секвенирование генома энтеровируса и филогенетический анализ позволяет определить тип и генотип энтеровируса, эволюционные изменения и происхождение энтеровирусов. В научной литературе недостаточно данных о циркуляции отдельных типов энтеровирусов и их генетическом разнообразии на большом числе территорий в течение длительного периода времени, и сведений о распространённости неполиомиелитных энтеровирусов среди детей из закрытых детских коллективов. Также недостаточно информации об обнаружении энтеровирусов разных типов и генотипов у детей из семей мигрантов, прибывших на территории РФ из неблагополучных по полиомиелиту стран. В связи с усилением миграционных процессов между странами СНГ создается возможность импортирования и последующего распространения на территориях региона энтеровирусов, разных типов и генотипов, ранее на них не циркулировавших.

Решение этих проблем определило цель и задачи данного исследования.

Цель исследования: выявить и охарактеризовать энтеровирусы, циркулирующие среди населения и обнаруженные в объектах окружающей среды на 14 территориях России в течение длительного периода наблюдения.

Задачи исследования:

1. Расшифровать этиологию подъёмов заболеваемости энтеровирусной инфекцией на 14 территориях России в разные временные периоды. Определить

частоту выделения полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов от больных с синдромом острого вялого паралича.

2. Провести молекулярный анализ энтеровирусов, вызвавших подъемы энтеровирусной инфекции на отдельных территориях, с целью установления типов и генотипов энтеровирусов, циркулирующих среди населения.

3. Выявить и идентифицировать энтеровирусы у здоровых детей из семей мигрантов, сравнить типы и генотипы энтеровирусов, обнаруженных у этих детей и у детей резидентов 14 территорий России.

4. Изучить энтеровирусы, выделенные из проб сточной воды на отдельных территориях, используя вирусологические и молекулярные методы исследования, и сравнить их с энтеровирусами, изолированными от больных энтеровирусной инфекцией.

Научная новизна работы

Анализ ситуации по энтеровирусной инфекции за многолетний период на 14 территориях России дал возможность показать смену типов энтеровирусов, доминировавших в циркуляции среди населения и вызвавших периодические подъёмы заболеваемости энтеровирусной инфекцией на отдельных территориях в разные годы.

Комплекс вирусологических и молекулярно-генетических исследований позволил установить, что в один и тот же временной период на пяти территориях региона преимущественно циркулировали энтеровирусы вида В, вызвавшие подъём заболеваемости энтеровирусным менингитом, а на четырёх территориях в основном циркулировали энтеровирусы вида А, обусловившие подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией с клиникой экзантемы полости рта и конечностей.

С помощью филогенетического анализа выделенных энтеровирусов была выявлена циркуляция среди населения новых для региона генотипов и генетических вариантов энтеровирусов нескольких типов. В 2013 году подъёмы заболеваемости энтеровирусным менингитом на большинстве территорий региона были связаны с появлением нового для России генотипа h вируса ЕСНО 30. В

2017 году рост заболеваемости экзантемными формами ЭВИ на многих территориях региона был обусловлен несколькими генетическими вариантами нового для России пандемического генотипа энтеровируса Coxsackievirus (CVA) A6.

Впервые было показано, что на одной из территорий подъем заболеваемости энтеровирусным менингитом был обусловлен энтеровирусом ЕСНО 18, ранее не вызывавшим массовых заболеваний на территориях региона.

Выявлено значительное разнообразие типов и генотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от людей на отдельных территориях, при этом доля разных типов энтеровирусов в структуре выделенных вирусов менялась в разные годы.

Впервые была дана вирусологическая и молекулярная характеристика неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у детей из семей мигрантов, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту территорий. Из материала от этих детей были выделены ранее не циркулировавшие на территориях, находившихся под наблюдением, энтеровирусы (CVA 13, 17 и 24, EV 75, 99 и 120).

Установлено, что энтеровирусы Coxsackievirus B2, B3, B4 и B5 распространены на всех территориях. Эти вирусы в период наблюдения были выделены от всех категорий обследованных лиц (больных с синдромом острого вялого паралича и энтеровирусной инфекцией, здоровых детей), а также из проб сточной воды. Показано их генетическое разнообразие.

Теоретическая и практическая значимость работы

Расшифрована этиология сезонных подъемов энтеровирусной инфекции на 14 территориях РФ. Показано, что для установления конкретных возбудителей энтеровирусной инфекции необходимо использование как вирусологических, так и молекулярных методов исследования.

Доказано, что увеличение притока трудовых мигрантов является серьезным фактором риска завоза неполиомиелитных энтеровирусов новых типов с неблагополучных по полиомиелиту территорий на территории, находившиеся под

наблюдением.

Показана широкая циркуляция неполиомиелитных энтеровирусов в закрытых детских коллективах. Установлено, что при заносе энтеровирусов в детские учреждения имело место их распространение в коллективе, приведшее к бессимптомному носительству энтеровирусов.

Комплексный подход к диагностике энтеровирусной инфекции позволил выявить более широкий спектр неполиомиелитных энтеровирусов, которые циркулировали среди населения и обнаруживались в пробах из окружающей среды. Установлена корреляция между частотой выделения некоторых широко распространенных типов энтеровирусов (ЕСНО 6, ЕСНО 30, СVB) от больных энтеровирусной инфекцией и частотой их детекции в пробах из объектов окружающей среды.

Методология и методы исследования

В исследовании были использованы вирусологические (выделение вирусов на культуре клеток, идентификация энтеровирусов в реакции нейтрализации) и молекулярно-биологические (выделение РНК, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ) методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Этиология различных форм энтеровирусной инфекции определяется энтеровирусами, которые циркулируют среди населения. В годы преимущественной циркуляции вирусов ЕСНО разных типов и Coxsackievirus В энтеровирусная инфекция протекала в форме энтеровирусного менингита. Преобладание в циркуляции среди населения Coxsackievirus А разных типов обусловило возникновение экзантемных форм энтеровирусной инфекции. Смена и импортирование новых типов и генотипов энтеровирусов, циркулирующих среди населения 14 территорий России в течение периода наблюдения приводила к периодическим подъемам заболеваемости различными формами энтеровирусной инфекции.

2. Выявлены различия в спектре энтеровирусов, обнаруженных у детей резидентов и у здоровых детей из семей мигрантов. Обследование здоровых детей

из семей мигрантов позволило изолировать у них ранее не циркулировавшие на 14 территориях энтеровирусы CVA13, A17 и A24, EV 75, 99 и 120. У детей резидентов были обнаружены только энтеровирусы, циркулирующие на территориях.

3. Установлено, что из проб сточной воды были выделены неполиомиелитные энтеровирусы Coxsackievirus B, вирусы ЕСНО 30 и ЕСНО 6, которые интенсивно циркулировали среди населения. Выявлена корреляция между частотой их детекции у обследованных больных и в пробах сточной воды.

Личный вклад автора заключается в проведении вирусологических исследований биологического материала, полученного от больных с синдромом ОВП, ЭВИ и здоровых лиц, изолятов и концентратов сточной воды, полученных с территорий СПб РЦ, выполнении молекулярно-генетических исследований выделенных штаммов энтеровирусов, анализе форм Федерального государственного статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и документации для подтверждения свободного от полиомиелита статуса территорий. Автором были проанализированы и обобщены результаты исследований, подготовлены материалы к публикациям, поданы заявки на депонирование нуклеотидных последовательностей в международную базу данных GenBank.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы определяется использованием современных методов исследования, проведением экспериментов в соответствии с национальными методическими документами и методическими рекомендациями ВОЗ для проведения вирусологических и молекулярно-генетических исследований, значительным объёмом выполненных исследований, применением статистических методов для обработки полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на Международной научной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 5-7 июня 2013 г.); IV Всероссийской конференции «Профилактическая медицина - 2013» (Санкт-Петербург, 27 ноября 2013 г.); Научно-практической

конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Нижний Новгород, 25 мая 2016 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Московская обл., 1-3 ноября 2016 г.); Научной конференции молодых учёных «OpenBio-2017» (Новосибирская обл., наукоград Кольцово, 24-26 октября 2017 г.); Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «XXI Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г.); Второй международной конференции молодых ученых Международной Пастеровской сети институтов 2nd International StaPa Retreat (Греция, Афины, 21-23 июня 2018); Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г.); XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2-4 октября 2019 г.).

Публикации. Основные положения диссертации отражены в 31 научной работе, 12 из которых опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК или входящих в базы данных Web of Science и/или Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, включает 14 таблиц и 32 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 198 источников, из них 66 отечественных авторов, 132 зарубежных.

Внедрение результатов исследования.

Результаты настоящей работы были использованы в трёх аналитических

обзорах:

1. Совершенствование эпидемиологического и вирусологического надзора за полиомиелитом в постсертификационный период ликвидации инфекции. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2013. – 88 с.

2. Особенности циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов в постсертификационный период ликвидации инфекции. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2015. – 72 с.

3. Двадцать лет работы в Глобальной программе ликвидации полиомиелита. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. – 88 с.

В международную базу данных GenBank были депонированы нуклеотидные последовательности участка генома VP1 57 штаммов энтеровирусов (номера KF986772-KF986797, KP861806-KP861810, KR185966-KR185981, KU841452-KU841465).

Полученные результаты были использованы в учебно-педагогическом процессе кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет" МЗ РФ. Кроме того, полученные в исследовании данные могут быть полезны для врачей вирусологов, эпидемиологов и других специалистов.

РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Энтеровирусы, строение и характеристика

1.1.1. Таксономия энтеровирусов

Род энтеровирусов относится к семейству пикорнавирусов (*Picornaviridae*), порядок *Picornavirales*. Это семейство характеризуется икосаэдрической симметрией капсида, геном представлен одноцепочечной положительно заряженной рибонуклеиновой кислотой [22, 163]. Пикорнавирусы принадлежат к числу самых мелких из известных РНК-содержащих вирусов, их название происходит от: «*pico*» – маленькие, «*rna*» – РНК. Они составляют одно из наиболее многочисленных и важных семейств возбудителей заболеваний человека и сельскохозяйственных животных [49, 163].

Согласно первоначальной классификации, в зависимости от способности размножаться в клетках человека и приматов, инфекционности и патогенности для различных видов животных, а также антигенных различий энтеровирусы делили на:

- три серотипа полиовирусов (обычно не патогенны для мышей),
- вирусы Coxsackievirus A (вызывают острый вялый паралич у мышей),
- вирусы Coxsackievirus B (вызывают спастический паралич у мышей),
- вирусы ЕСНО (в то время считались не вызывающими заболевания ни у людей, ни у мышей).

Изучение энтеровирусов началось в 1908 г. с поисков патогена, вызывающего паралич у детей. Путём заражения обезьяны фильтратом, взятым у больного полиомиелитом, было доказано, что болезнь вызвана вирусом [127]. О существовании трёх серотипов полиовирусов (ПВ) было сделано предположение, когда выяснилось, что ни одна антисыворотка не способна нейтрализовать все изучаемые штаммы ПВ. Введение в практику антисывороток к полиовирусам позволило обнаружить, что в фекалиях, отобранных у детей с паралитическими проявлениями, похожими на полиомиелит, присутствуют иные кишечные вирусы,

схожие с полиовирусами, однако отличающиеся от них по серологическим свойствам [143]. В испытаниях на животных неизвестный вирус вызывал паралич скелетной мускулатуры у новорожденных мышей и хомяков, однако не был патогенен для взрослых мышей, хомяков и макак-резусов, не вызывал поражение ЦНС [88]. Вскоре он получил название вирус Coxsackie (впоследствии Coxsackievirus A) по названию места в Нью-Йорке, где был впервые обнаружен. Дальнейшее изучение показало, что вирусы Coxsackievirus A поражают скелетную и сердечную мускулатуру экспериментальных животных, тогда как Coxsackievirus B реплицируются во многих тканях, включая ЦНС, печень, поджелудочную железу, бурый жир и поперечнополосатые мышцы [105].

Введение в вирусологическую практику клеточных культур позволило выделять вирусы, не размножающиеся в экспериментальных животных. Вирусы ЕСНО были названы так, поскольку их связь с каким-либо заболеванием человека сразу не была установлена («ЕСНО» расшифровывается как «enteric, cytopathogenic, human, orphan: no associated disease»). В 1955 г. было предложено убрать из подгруппы любой вирус ЕСНО, который вызовет клинически уникальное заболевание у человека. Впоследствии были обнаружены патогенные для мышей вирусы, имеющие сходные характеристики с вирусами ЕСНО, а также вирусы ЕСНО, вызывающие широкий спектр заболеваний у человека. Однако определённые серотипы коррелируют с широким спектром клинических проявлений, поэтому вирусы ЕСНО остались в своей подгруппе.

Следующим вновь обнаруженным серотипам энтеровирусов присваивали порядковые номера начиная с EV68 [87, 145]. После разработки молекулярных методов типирования и пересмотра старой ограниченной классификационной схемы энтеровирусы делят на серотипы в зависимости от организации их генома, сходства последовательности нуклеотидов и биологических свойств [150, 161].

Современная классификация энтеровирусов постоянно пересматривается и уточняется. Согласно последним изменениям базы данных Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) [185, 190], семейство пикорнавирусов включает в себя 47 родов, из которых особенно важен род энтеровирусов. К нему

относятся 12 видов энтеровирусов: 4 вида энтеровирусов человека (А, В, С, D), в том числе полиовирусы трёх серотипов, принадлежащие к виду С, 8 видов энтеровирусов животных различных видов (Е, F, G, H, I, J, K, L) и с 2008 г. 3 вида риновирусов (А, В, С). Среди ЭВ видов А-D также имеются серотипы, патогенные для обезьян. Серотипы отличаются друг от друга по иммунному ответу организма хозяина, используемым рецепторам и в меньшей степени по спектру клинических проявлений, возникающих после инфицирования.

В настоящее время известно более ста серотипов энтеровирусов человека (табл. 1) [178, 185]. Три серотипа полиовирусов ранее входили в отдельный вид, однако после исследований Brown B. et al они были включены в вид С, поскольку отличаются от других ЭВ вида С только в капсидном регионе, а штаммы CVA15 и CVA18 следует считать CVA11 и CVA13 соответственно [78].

Таблица 1

Классификация энтеровирусов человека

Вид	Серотипы, принадлежащие к виду
Энтеровирус человека А	Coxsackievirus A 2-8, 10, 12, 14, 16 Enterovirus 71, 76, 89-92, 114, 119-125
Энтеровирус человека В	Coxsackievirus A9, Coxsackievirus B 1-6, ECHO 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, Enterovirus 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, 110-114
Энтеровирус человека С	Poliovirus 1-3 Coxsackievirus A 1, 11, 13, 17, 19-22, 24 Enterovirus 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116-118
Энтеровирус человека D	Enterovirus 68, 70, 94, 111, 120

Основанием для идентификации энтеровируса, как представителя серотипа, является идентичность более 75% нуклеотидной и 85% аминокислотной последовательности участка VP1 с любым штаммом известного серотипа [1]. В

2010 г. в Хабаровске впервые в России был открыт новый, не описанный ранее серотип энтеровируса: EV116 [1].

1.1.2. Строение вириона и жизненный цикл энтеровирусов

Строение энтеровируса было определено путём рентгеноструктурного анализа в 1985 г [103]. Вирионы имеют диаметр около 30 нм. Центральная их часть занята свёрнутой молекулой РНК, окружённой капсидом из 60 полипептидных субъединиц, собранных в икосаэдр (рис. 1.1) [164].

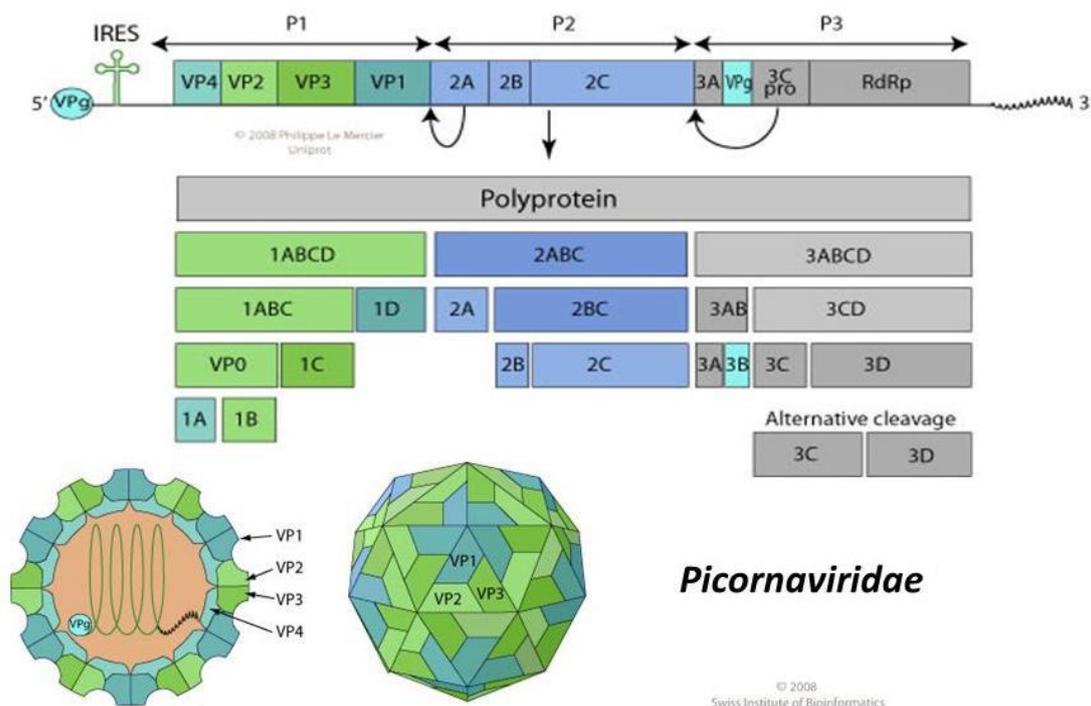


Рис. 1.1. Схематическое строение вириона энтеровируса [189].

Липидная оболочка у вириона отсутствует. Его общая молекулярная масса составляет 8,5 мегадальтон. Белки капсида представлены четырьмя негликозилированными полипептидами: VP1, VP2, VP3, VP4 (пронумерованы согласно убыванию молекулярной массы). Белки VP1-3 находятся на поверхности капсида, VP4 - на внутренней его части. Белки VP1-3 относительно похожи по структуре: каждый белок имеет ядро, идентичное по топологии для всех трёх белков, и различные модификации (дополнения (extensions) на N- и C-концах, вставки). VP4 имеет более вытянутую конформацию [103]. Вирусный серотип определяется C-концами капсидных белков, которые находятся на внешней

поверхности вириона - это главные антигенные участки вируса.

Геном энтеровирусов представлен одноцепочечной молекулой РНК длиной от 7,2 до 8,4 килобаз. С 5'-концом РНК ковалентно связан белок VPg (virus protein, genome linked), состоящий из 22 аминокислот. После его удаления клеточными ферментами начинается синтез вирусной РНК. Энтеровирусный геном кодирует одну открытую рамку считывания. Продуктом трансляции вирусной РНК является гигантская молекула протеина-предшественника, которая затем разрезается вирусными протеазами на структурные (VP1-VP4) и неструктурные (РНК-зависимую РНК-полимеразу, протеазы и другие) белки [81, 103, 163, 195]. В начале цепи РНК за 5'-нетранслируемым регионом (5'UTR) следует открытая рамка считывания, кодирующая полипротеин. За ней следует короткий 3'-нетранслируемый регион (3'UTR) и поли-А последовательность [139, 150]. РНК пикорнавирусов инфекционна, т.е. экстрагированные из вирионов или заражённых клеток вирусспецифические РНК могут в определённых условиях проникать в клетку и инициировать инфекцию. Удаление поли(А)-последовательности приводит к резкому снижению инфекционности РНК [16].

Цикл репродукции энтеровирусов составляет 6-7 часов [164]. Процесс репликации начинается с прикрепления вируса к одной из молекул клеточной поверхности. Большинство известных энтеровирусных рецепторов относится к суперсемейству иммуноглобулинов [95, 167], среди которых рецепторы к полиовирусу и вирусам Коксаки. Рецептор к полиовирусу – это гликопротеин CD155, экспрессируемый на поверхности многих типов клеток человека и некоторых других приматов [146]. Среди рецепторов, не принадлежащих к этому суперсемейству, известны фактор ускорения распада комплемента (decay accelerating factor), рецепторы липопротеинов низкой плотности (LDL-R, SCARB2), интегрины [125, 142].

После прикрепления к поверхностному клеточному рецептору вирус входит в клетку путём различных механизмов эндоцитоза. Конкретный механизм входа зависит от типа энтеровируса и клетки [125] и занимает 15-30 минут, после чего вирусные частицы обнаруживаются уже в эндосомах [142]. В результате

структурных изменений вирусной частицы происходит прикрепление капсидных белков к эндосомальной мембране и высвобождение вирусного генома в цитоплазму [125]. Процесс занимает около двух часов. Клеточные ферменты удаляют белок VPg с 5'-конца освободившейся РНК [81, 142]. После этого участок внутренней посадки рибосомы (IRES), находящийся на 5'UTR, взаимодействует с рибосомами инфицированной клетки, чтобы инициировать трансляцию вирусного генома [152, 166].

Количество вирусных белков, синтезируемых в инфицированной клетке, больше, чем может быть закодировано в небольшом геноме энтеровируса. РНК кодирует гигантскую молекулу протеина-предшественника, которая затем подвергается серии расщеплений вирусными протеазами. Геном энтеровируса любого типа содержит две протеазы: 2А и 3С. Помимо нарезки вирусных полипротеинов эти ферменты выполняют функцию расщепления белков клетки-хозяина, многие из которых вовлечены в активацию иммунного ответа [131, 132, 151, 192] или трансляции [86, 112, 121, 126], препятствуя синтезу клеточных белков и освобождая рибосомы для трансляции белков вируса [130]. Кроме того, было показано, что и продукты расщепления клеточных протеинов также могут вызывать патологию: например, продукт расщепления структурного белка дистрофина вызывает дистрофическую кардиомиопатию у подопытных мышей [72].

В результате трансляции образуются белки Р1-3. Белок Р1 разрезается вирусными протеазами на белки VP0, VP3 и VP1. VP0 затем разрезается на VP2 и VP4, что является заключительной стадией созревания вириона. Белки-предшественники Р2 и Р3 заключают в себе семь неструктурных протеинов (2А-2С и 3А-3D). Многие промежуточные продукты сами являются функциональными единицами [142, 188]. Дальнейшее протеолитическое расщепление приводит к образованию ряда других вирусных белков, включая АТФазу, VPg и РНК-полимеразу – продукты протеолиза VP3 [81].

Участие ядра для репликации вирусного генома не требуется, что показано в опытах на клетках, лишённых ядер [81]. Синтезированная вирусная РНК может

либо перейти в следующий цикл трансляции и репликации, либо упаковаться в капсид [187]. Репликация и сборка происходят в специализированных двумембранных структурах: «вирусных фабриках репликации». Эти похожие на органеллы везикулы обнаруживаются в цитоплазме практически сразу после внедрения ЭВ в клетку и, по разным данным, формируются либо из аппарата Гольджи, либо эндоплазматического ретикулума [73, 162].

Согласно классическим представлениям, вирусные частицы выходят из клетки после её лизиса [22, 125]. Однако описаны случаи, когда выход вирусных частиц из клетки не нарушает мембрану клеточной культуры, что свидетельствует о выходе вирусных частиц без лизиса мембраны и цитопатического эффекта [83].

1.1.3. Изменчивость генома энтеровирусов

Энтеровирусы подвержены интенсивной генетической изменчивости, из-за чего могут появляться новые патогенные для человека серотипы. Это происходит по двум причинам: во-первых, потому что при синтезе новой цепи вирусной РНК не происходит коррекция ошибок считывания (в случае полиовирусов каждая новая молекула РНК имеет в среднем одну мутацию) [67], во-вторых, из-за рекомбинации, когда два вируса, находясь в одной клетке, обмениваются участками генетического материала [153]. Для энтеровирусов известно два механизма рекомбинации: смена матрицы при работе РНК-полимеразы [69, 138] и независимое от репликации соединение фрагментов РНК, что, предположительно, случается намного реже и при определённых условиях [98]. Смена матрицы считается основным механизмом рекомбинации у энтеровирусов, она необходима для восстановления генома, повреждённого, к примеру, действием рибонуклеаз, а также как способ эволюции вирусного генома [69, 138]. В то же время рекомбинация служит для поддержания стабильности тех областей вирусного генома, которые хорошо показали себя в процессе эволюции. Филогенетический анализ некапсидных регионов (2С, 3D, частично 3А, 3С) прототипных штаммов, циркулировавших в 60-х и 70-х годах XX века, и современных штаммов тех же серотипов показал, что современные штаммы группируются вместе и не группируются с прототипными по указанным участкам генома. Это говорит о

снижении генетического разнообразия энтеровирусов с одной стороны – и отборе в пользу эволюционно полезных участков генома с другой [123].

В результате рекомбинации получаются гибридные формы вирусов, совмещающие признаки обоих родительских штаммов, с возможным изменением тропизма, антигенного профиля, устойчивости к лекарственным препаратам, патогенности. Было установлено, что рекомбинантные потомки двух совместно культивируемых в течение одного пассажа штаммов полиовирусов составляют от 1 до 20 % от общего числа вирусов. Сравнительная частота рекомбинации в разных участках генома неодинакова: структурные гены подвергаются рекомбинации реже, чем не структурные [22, 85, 153, 168, 195].

Изучение частоты рекомбинантных событий является актуальной задачей, поскольку из-за технологических ограничений в геномных базах данных представлены преимущественно фрагменты генома тех типов энтеровирусов, которые представляли эпидемическое значение. В последнее время в связи с удешевлением технологий секвенирования в базе данных GenBank стало появляться больше полногеномных последовательностей энтеровирусов различных штаммов, что позволило проводить крупномасштабные исследования в области рекомбинации [153]. Выяснилось, что капсидный регион энтеровирусного генома крайне редко подвергается рекомбинации. «Горячей точкой» рекомбинации являются конец 5'UTR, где данный фрагмент генома соединяется с VP4 регионом (что также подтверждается другими исследованиями [122, 152]), и P2 регион, в особенности часть 2A [153].

Генетическая изменчивость ЭВ позволяет полиовирусам вакцинного происхождения рекомбинировать в организме человека между собой [47], образуя межтипичные рекомбинанты, а также с другими штаммами энтеровирусов вида С [67, 78, 168], что является причиной возникновения ПВ вакцинного происхождения, обладающих повышенной нейровирулентностью. Это имеет большое значение для Программы ликвидации полиомиелита, поскольку во многих регионах мира, где для вакцинации используется оральная полиомиелитная вакцина, одновременно широко циркулируют энтеровирусы вида

С. Вакцинородственные штаммы, подвергшиеся определённой мутации в области генома капсидного белка VP1, представляющей собой «горячую точку» мутаций, могут вызвать паралитический полиомиелит, ассоциированный с вакцинацией [166]. В процессе длительной репликации вакцинных полиовирусов в одном организме повышается вероятность их рекомбинации с неполиоэнтеровирусами, попавшими в тот же организм. В таком случае капсидный участок РНК рекомбинантного вириона заимствуется из генома вакцинного полиовируса, а неструктурные участки частично либо целиком принадлежат другому энтеровирусу [113]. Кроме того, в процессе репликации таких вирусов могут происходить нуклеотидные замены (мутации), и в случае, когда это происходит в сайте аттенуации, происходит возврат вируса к дикому типу. Образуются вакцинородственные штаммы, обладающие повышенной нейровирулентностью и способные вызывать паралитические формы заболевания [171].

Случаи спорадических заболеваний и вспышек энтеровирусной инфекции, вызванные изменёнными по сравнению с предковым штаммом энтеровирусами, описаны в разных странах. Так, в 1989 г. в Венгрии произошла крупная вспышка ЭВИ, вызванная одним из самых распространённых серотипов энтеровирусов: ЕСНО11 (386 случаев, из них 13 с летальным исходом). Штаммы вируса, выделенные от больных в Венгрии, при сравнении со штаммами, выделенными в соседних странах в тот же период времени, имели нуклеотидные различия на участках генома, кодирующих капсид вируса. В Румынии и Финляндии в тот же период циркулировали генетически очень близкие к описываемому штамму ЕСНО11, однако повышения заболеваемости в этих странах не было зафиксировано. Что говорит о том, что даже небольшая замена в нуклеотидном составе ЭВ может привести к появлению эпидемически значимого генотипа вируса [85].

1.2. Роль энтеровирусов в инфекционной патологии

Энтеровирусные заболевания наблюдаются повсеместно в виде спорадических форм, групповых заболеваний и эпидемических вспышек. В странах с умеренным климатом энтеровирусные инфекции обладают ярко

выраженной сезонностью: наибольшее количество заболевших появляется в летние и осенние месяцы. В тропическом климате энтеровирусы циркулируют среди населения круглый год [164].

Повсеместная циркуляция энтеровирусов среди населения обусловлена рядом факторов, среди которых следует отметить высокую восприимчивость людей, возможность длительного вирусоносительства при отсутствии видимых проявлений, способность вирусов долго сохраняться в объектах окружающей среды (водоёмах, сточной воде). В большинстве случаев энтеровирусная инфекция клинически никак не проявляется, однако у некоторых пациентов может наблюдаться широкий спектр симптомов. Различные энтеровирусы способны обусловить развитие одних и тех же симптомов, вместе с тем, один и тот же энтеровирус может быть причиной заболеваний с разной клинической картиной [14]. Так, как минимум 23 серотипа ЭВ способны вызывать экзантему полости рта и конечностей, распространённое заболевание у детей [183]. Частота носительства энтеровирусов у здоровых детей зависит от возраста: чем младше ребёнок, тем чаще он бывает носителем. С возрастом прослойка детей, имеющих антитела к циркулирующим на данной территории штаммам энтеровирусов, увеличивается [22]. Так, к 1 году жизни порядка 50% детей серопозитивны к наиболее распространённым серотипам энтеровирусов [23]. У взрослых болезнь протекает, как правило, в виде обычной ангины или респираторной инфекции. Однако ЭВ Coxsackievirus В способны вызывать у взрослого населения разнообразную тяжёлую органопатологию и даже генерализованные формы заболевания [57].

Источником инфекции могут стать как больные, так и здоровые носители, у которых не проявляются симптомы инфекции. Основной путь передачи вируса – контактно-бытовой, меньшую роль играют водный и пищевой пути. Основной механизм передачи энтеровирусных инфекций – фекально-оральный, вероятен также аэрозольный. После проглатывания вирус начинает размножаться в слизистых оболочках ротоглотки и кишечника, через лимфатические узлы выходит в кровь и с её током попадает к различным тканям. Чаще всего на этой

стадии инфекция заканчивается [183]. В первые дни заболевания возбудитель в большом количестве выделяется из слизистых оболочек зева пациента, обнаруживается в крови, моче, носоглотке и фекалиях за несколько дней до появления клинических симптомов. Выделение с фекалиями может продолжаться от нескольких недель до двух месяцев, когда вирус уже не обнаруживается ни в крови, ни в смывах из зева. Длительность выделения зависит от штамма вируса и состояния иммунной системы индивидуума [22, 65, 164].

Основным резервуаром энтеровирусов во внешней среде являются хозяйственно-бытовые сточные воды, загрязнённые фекалиями. Энтеровирусы устойчивы к различным физическим и биологическим воздействиям, кроме того, в сточных водах содержится большое количество белковых компонентов, стабилизирующих структуру вируса и замедляющих их разрушение – хотя некоторые компоненты промышленных стоков могут наоборот инактивировать вирус. Загрязнённые сточные воды могут попадать в открытые водоёмы, используемые для забора питьевой воды и для купания населения, и обуславливать заболеваемость ЭВИ. Нередко из образцов воды, взятой из этих водоёмов и системы центрального водоснабжения, обнаруживаются энтеровирусы тех же серотипов, которые вызвали вспышку [35, 58, 65, 107]. Мониторинг сточных вод является важной частью надзора, выполняемого в ходе Программы ликвидации полиомиелита, поскольку позволяет отслеживать циркуляцию ПВ среди населения. С его помощью можно установить область проживания лиц, распространяющих вирус, и оперативно провести противоэпидемические мероприятия [77].

Энтеровирусы обладают тропизмом к нервной ткани, мышцам и эпителиальным клеткам, что проявляется и в клинической картине болезни, и в морфологических изменениях тканей [18], причём разные виды энтеровирусов поражают различные участки ЦНС [166]. Инфицирование передних рогов или нижних моторных нейронов позвоночного столба вызывает острый вялый паралич – это общий термин, обозначающий неспецифический клинический синдром [196]. Паралич конечностей может возникнуть по различным причинам,

однако до появления вакцинации наиболее часто его вызывал полиовирус [141], кроме того, некоторые другие энтеровирусы также могут способствовать его развитию.

Энтеровирусы Coxsackievirus В чаще всего ответственны за вирусные болезни сердца, например, инфекционный миокардит: серьёзное заболевание, которое может стать причиной дилатационной кардиомиопатии и сердечной недостаточности [180]. Инфекционный миокардит может также быть вызван энтеровирусом ЕСНО 6 и полиовирусами [140]. Энтеровирусы Coxsackievirus А могут вызвать вялый паралич, тогда как Coxsackievirus В – спастический. Другие заболевания, связанные с вирусами Coxsackievirus А, это геморрагический конъюнктивит, с Coxsackievirus В – герпангина, плевродиния, перикардит, панкреатит и менингоэнцефалит. С обеими этими группами энтеровирусов могут быть связаны асептический менингит [176] и обычная простуда [116]. Вирусы ЕСНО вызывают различные симптомы: от насморка и лихорадки до асептического менингита [29] и острого геморрагического конъюнктивита [166].

Несмотря на название, энтеровирусы сравнительно редко вызывают поражения желудочно-кишечного тракта, хотя он является первичным местом их репликации [183]. Помимо специфических клинических форм ЭВИ может протекать в виде простудоподобного заболевания (гипертермия, нарушение общего самочувствия, катаральные симптомы), заканчивающегося без последствий [23]. В разных исследованиях до 25% респираторных заболеваний (в том числе пневмония [108]) у детей связывают с инфицированием энтеровирусами различных серотипов [89, 109, 111, 165, 182].

Наиболее уязвимыми категориями населения являются новорожденные, дети и лица с иммунодефицитом, у которых заболевание может перейти в тяжёлую форму или привести к летальному исходу [94, 116]. Ряд авторов указывают на возможность летальных исходов как у взрослых, так и детей с диагнозами энцефалит, ящуроподобное заболевание (ЯПЗ), полиомиелитоподобное заболевание, кишечные расстройства, миокардит, вызванными различными серотипами вирусов [22]. Так, летальность у новорожденных с вирусным

миокардитом может составлять от 30 до 83% [174]. Исход энцефалитов считается благоприятным, однако у детей, перенесших заболевание в раннем возрасте, чаще наблюдаются выраженные остаточные явления, психические и речевые нарушения [62]. Инфицирование энтеровирусами Коксаки во время беременности может привести к спонтанному аборту, миокардиту у плода и задержке развития у новорожденного [94], а также в дальнейшем привести к развитию сахарного диабета 1-го типа у ребёнка [90]. Некоторые исследователи связывают энтеровирусы с диабетом 1-го типа, тем не менее для однозначного вывода о роли энтеровирусов в развитии этого заболевания данных пока недостаточно [102, 110, 186].

Несмотря на широту распространения энтеровирусов и экономический ущерб от случаев временной нетрудоспособности, вызванной энтеровирусной инфекцией, специфической терапии против энтеровирусов не существует, а вакцинация доступна лишь в отношении полиовирусов и отдельных эпидемически значимых серотипов НПЭВ. Разработка и введение в национальные прививочные календари инактивированной [172] и живой [170] вакцин против полиовируса значительно снизили заболеваемость полиомиелитом. А после принятия в 1988 г. Глобальной программы ликвидации полиомиелита уже к 2000 году частота случаев заболевания паралитическим полиомиелитом во всём мире упала на 99% [70, 124]. Разнообразие серотипов энтеровирусов и их генетическая изменчивость значительно затрудняют создание вакцин против этой группы возбудителей. В разных странах постоянно ведутся разработки вакцин против некоторых серотипов энтеровирусов, представляющих серьёзную проблему для здравоохранения [66, 129, 135, 194, 197], однако в мировой практике данные вакцины не применяются.

Энтеровирусы считаются наиболее распространённой причиной энтеровирусного «асептического» менингита [106], некоторые из них (Coxsackievirus B, ЕСНО 6, 7, 9, 11 и 30) вызывают крупные вспышки этого заболевания, другие чаще провоцируют отдельные случаи менингита [3, 5, 13, 24, 29, 61, 128]. Термин "асептический" следует понимать условно, поскольку он был

введён в 1925 г., а роль полиовируса, вирусов Coxsackievirus и ЕСНО в этиологии менингита была доказана позднее [37]. Чаще болеют городские жители, преимущественно дети в возрасте до 7 лет. Серозные менингиты распространены повсеместно как в форме спорадической заболеваемости, так и в форме вспышек, нередко весьма масштабных [23]. В годы, предшествующие данному исследованию, в РФ был зафиксирован ряд вспышек энтеровирусной инфекции: Свердловская область (2005 г., 2006 г., ЕСНО 6) [55], Хабаровск (2006 г., ЕСНО 30 и ЕСНО 6) [24], Владивосток (2008 г., ЭВМ и ЭВ лихорадка, ЕСНО 30) [56], г. Архангельск (2008 г., ЭВМ, ЕСНО 30) [63], Новгородская область (2008 г., ЭВМ, ЕСНО 6 и ЕСНО 30) [4], Новосибирская область (2008 г., ЭВМ, ЕСНО 30) [15], Астраханская область (2009 г., ЕСНО 30) [61], Мурманская область (2010 г., энтеровирусная экзантема полости рта и конечностей, Coxsackievirus A16) [25] и др.

Экзантема полости рта и конечностей (также энтеровирусная экзантема, в англоязычной литературе «hand-foot-and-mouth disease» (HFMD)), проявляющаяся в виде краткого повышения температуры и везикул на руках, ногах, ягодицах и во рту, в основном поражает детей до 10 лет. Обычно энтеровирусную экзантему вызывают вирусы Coxsackievirus A16 и EV71, зачастую циркулирующие совместно [134, 137], однако другие ЭВ вида А и В иногда становятся причиной вспышек и спорадических случаев этого заболевания [183].

Циркуляция этих серотипов энтеровирусов зафиксирована во многих странах. Больше всего от связанных с ними заболеваний страдают жители Азиатско-Тихоокеанского региона, где регистрируются крупномасштабные эпидемии HFMD [101, 118, 129, 177]. Болеют преимущественно дети до 5 лет. У большинства заболевших наблюдается герпангина, экзантема полости рта и конечностей лёгкой или средней тяжести, однако у части пациентов развиваются различные неврологические проявления: асептический менингит, острый вялый паралич, энцефалит и серьёзные системные расстройства, включая отёк лёгких и кардиореспираторный коллапс [101, 159, 160]. Летальность колеблется от 0,5% до 19% [136] в зависимости от генотипа вируса [169].

Впервые EV71 был выделен в 1969 г. в Калифорнии от 20 больных с поражением ЦНС [175], однако своё эпидемическое значение данный серотип приобрёл только через тридцать лет. За это время циркулирующие штаммы EV71 разделились на несколько генотипов разной степени патогенности [80]. На территории Европы пока регистрируют спорадические случаи и немногочисленные групповые заболевания, вызванные вирусами EV71, часто завезёнными с территории Юго-Восточной Азии [76]. Занос высоко патогенного штамма EV71 генотипа С4 на территорию Российской Федерации летом 2013 г. привёл к вспышке ЭВИ в Ростовской области. 139 детей были госпитализированы. Далее вирус распространился в другие области и был идентифицирован еще в 14 субъектах РФ [12, 54]. В 2016 г. появились сообщения о случаях заболевания ЭВИ с серьёзными неврологическими осложнениями, где этиологическим агентом был EV71 [93]. Полногеномное секвенирование изолята, выделенного от больной энцефалитом девочки, показало, что это был рекомбинантный штамм, белки оболочки которого принадлежали субгеногруппе С1, а кодирующий 3D полимеразу регион относился к новой, не представленной ранее линии [114].

Некоторые штаммы могут доминировать в циркуляции в течение нескольких лет, затем исчезать, чтобы появиться годы спустя. Например, энтеровирус 68 (EV68) впервые был выделен у детей с пневмонией в 1962 г., и до 2005 г. вызывал лишь единичные случаи заболевания, однако в 2014 г. стал причиной эпидемии в США и Канаде. Более 1000 детей были госпитализированы с острой респираторной инфекцией и неврологическими осложнениями [91, 92, 117]. В 2016 г. в некоторых европейских странах был отмечен подъём заболеваемости ЭВМ, связанный с EV68 [104], и с тех пор энтеровирусы этого серотипа выделяются в европейских странах от пациентов с разными клиническими симптомами от лёгкой формы ОРВИ до пневмоний с тяжёлым течением [147]. У пяти пациентов из 93 были отмечены тяжёлые неврологические нарушения. Наоборот, энтеровирус 70, ставший причиной крупномасштабных эпидемий острого геморрагического конъюнктивита в 1970-х годах в Африке и Азии, с тех

пор вызывает лишь локальные вспышки этого заболевания [181]. В России в 2014 г. были зафиксированы вспышки заболеваемости различными формами ЭВИ, вызванные вирусом Coxsackievirus A6. Данный вирус появился на территории нашей страны в 2010 г. и за несколько лет успел потеснить в ряде регионов в циркуляции среди населения такие распространённые ЭВ, как ЕСНО 30, ЕСНО 6, ЕСНО 9 и ЕСНО 11 [11]. Ещё одним примером может служить смена доминирующих серотипов в Северо-Западном регионе России, отмеченная в результате мониторинга с 1973 по 2004 года [28]. С развитием методов молекулярной диагностики стало возможно наблюдать не только смену ведущих серотипов, но и ведущего генотипов внутри одного серотипа энтеровируса на какой-либо территории [193]. Генотипы могут отличаться по клиническим проявлениям или степени патогенности, однако генетические различия между энтеровирусами одного серотипа пока изучены достаточно слабо. Классификация генотипов предложена для EV71 [80], ЕСНО 30 [71, 115], ЕСНО 11 [158], имеющих большое эпидемическое значение.

Активная трудовая и туристическая миграция населения способствует трансграничному распространению энтеровирусов. На Дальнем Востоке в приграничных областях циркулируют как ЭВ российского происхождения, так и ЭВ, генетически родственные вирусам из Японии, Китая и Таиланда. В 2013-2014 гг. на территориях Хабаровского края и Еврейской автономной области были выделены единичные штаммы EV71. По результатам молекулярно-генетических и филогенетических исследований данный штамм отнесён к подтипу С4а, для которого выявлена высокая степень (97%) гомологии с китайскими штаммами 2010-2011 гг. Китайские EV71 принадлежат к высокопатогенному С4 генотипу, который отличается от генотипа С2, циркулирующего в Европейских странах [59]. Исследователи не исключают возможности занесения EV71 и возникновения вспышек связанной с ним инфекции в приграничные с Китаем территориях [2].

1.3. Лабораторная диагностика энтеровирусной инфекции

С 2006 года в Российской Федерации введена обязательная регистрация всех случаев энтеровирусной инфекции. Надзор за энтеровирусными инфекциями

включает мониторинг заболеваемости ЭВИ, в том числе энтеровирусного менингита – наиболее распространённой формы энтеровирусной инфекции, требующей госпитализации. Кроме того, проводится слежение за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов путём исследования материала от больных с подозрением на энтеровирусную инфекцию и проб из объектов окружающей среды [40, 99]. Лабораторный мониторинг осуществляют сеть вирусологических лабораторий «Центров гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, шесть вирусологических лабораторий Региональных центров по надзору за полиомиелитом и острыми вялыми параличами, курирующих закреплённые за ними административные территории, и Национальная полиомиелитная лаборатория на базе Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (г. Москва).

Для лабораторной диагностики энтеровирусной инфекции в зависимости от особенностей клинической картины заболевания используют следующие типы клинического материала: спинномозговая жидкость; смыв из ротоглотки/носоглотки; отделяемое конъюнктивы, везикул, язв при герпангине; образцы фекалий. При необходимости может быть исследован аутопсийный материал: ткани головного, спинного, продолговатого мозга, печени, легких, миокарда, лимфоузлы, содержимое кишечника и ткань кишечной стенки (в зависимости от особенностей имевшей место клинической картины заболеваний) [40, 65, 100]. Некоторые недавно открытые энтеровирусы не обнаруживаются в образцах фекалий и/или спинномозговой жидкости, только в смывах из носо/ротоглотки [104]. Лабораторную диагностику проводят как путём классических вирусологических методов, так и с помощью молекулярно-биологических методов [65, 150].

1.3.1. Вирусологический метод диагностики

Выделение энтеровирусов проводят на чувствительных культурах клеток. Согласно Руководству ВОЗ по лабораторным исследованиям полиомиелита [48], для исследования материала, потенциально содержащего полиовирусы, рекомендованы две культуры клеток: RD (клетки рабдомиосаркомы человека) и

L20В (генетически модифицированные мышинные клетки, экспрессирующие рецептор к полиовирусу). Выбор двух данных линий позволяет стандартизовать методику исследования проб в разных лабораториях, осуществляющих надзор за циркуляцией полио- и энтеровирусов. Клетки RD поддерживают рост полиовирусов, вирусов ЕСНО и Coxsackievirus A (за исключением A1, A19 и A22), клетки L20В поддерживают только рост полиовирусов и некоторых серотипов Coxsackievirus A (2 - 6, 8, 10 и 14), причём цитопатогенное действие (ЦПД), оказываемое на эту культуру вирусами Coxsackievirus A, отличается от действия полиовирусов. Кроме того, для увеличения вероятности выделения энтеровируса из исследуемого материала методические рекомендации позволяют использовать культуру Нер2, чувствительную к полиовирусам и вирусам Coxsackievirus В. Выделение вируса даёт ответ на вопрос об этиологии заболевания и позволяет использовать выделенный вирус для последующих исследований [65].

Идентификацию полиовирусов вирусологическим методом проводят путём постановки реакции микронеутрализации с набором диагностических иммунных сывороток, специфичным к трём серотипам полиовирусов, в 96-луночном планшете. Идентификацию неполиомиелитных энтеровирусов осуществляют с помощью смесей сывороток, поскольку большое число различных серотипов энтеровирусов делает типирование моноспецифичными сыворотками практически невозможным. Смеси сывороток готовят по перекрывающей схеме, что позволяет определить большинство наиболее часто встречающихся энтеровирусов [40, 48]. Первые высокоактивные поликлональные сыворотки, идентифицирующие 42 типа энтеровирусов, были получены от обезьян и породистых лошадей: препараты LBM [144]. Затем использовались 27 типоспецифических референс-сывороток RIVM. Эти смеси производства Национального института охраны здоровья и окружающей среды (Нидерланды) рекомендовались для исследований в сети полиолабораторий ВОЗ, однако их производство было остановлено после введения в широкую практику молекулярных методов типирования энтеровирусов [100]. Производство

отечественных кроличьих поликлональных энтеровирусных сывороток было приостановлено в начале 2000-х годов из-за неудовлетворительных эксплуатационных характеристик [20]. Однако не все энтеровирусы могут быть идентифицированы этим методом.

Исследователи отмечают, что существенным недостатком использования клеточных культур для выявления НПЭВ является наличие большой группы некультивируемых и плохо культивируемых серотипов, остающихся за пределами поля зрения. Так, энтеровирусы Coxsackievirus A вирусологическим методом удаётся обнаружить не всегда [60]. Изучение ЭВ по сути является «побочным продуктом» надзора за полиовирусами в рамках Программы ликвидации полиомиелита. Клеточная линия RD, используемая в рамках лабораторной сети ВОЗ для выделения ПВ и НПЭВ, прежде всего поддерживает рост ЭВ вида В, даже если в образце присутствуют ЭВ других видов. Во многих работах было показано, что штаммы, выделенные на клеточной линии RD, в основном относятся к виду В [96]. Введение в протокол исследования проб других чувствительных к энтеровирусам культур, например, Her2 и MCF-7, позволяет успешно выделять ЭВ вида С.

1.3.2. Молекулярно-биологический метод диагностики

Наряду с вирусологическим методом используются молекулярно-биологические методы: полимеразная цепная реакция и секвенирование генома вирусов, которые в России осуществляются в соответствии с нормативными документами [34]. Молекулярные методы высоко чувствительны и специфичны, не требуют длительного периода инкубации и позволяют выявлять вирусы, не размножающиеся в культуре клеток [133]. Мишенью для ПЦР-диагностики чаще всего является высококонсервативный 5'-нетранслируемый регион энтеровирусного генома, что позволяет обнаруживать практически все серотипы энтеровирусов [154]. Применение ПЦР рекомендовано при:

- необходимости проведения исследований большого количества образцов при развитии вспышек ЭВИ;
- решении рутинных задач клинической диагностики;

- осуществлении эпидемиологического надзора за энтеровирусами как элемента скрининга в сочетании с методиками молекулярного генотипирования энтеровирусов и/или вирусологическими исследованиями;

- осуществлении оперативного надзора за определенными серотипами энтеровирусов, ассоциированными со вспышками заболеваний, с применением генотипоспецифических тест-систем;

- для выявления энтеровирусов, не вызывающих ЦПД на культуре клеток [65].

Наличие референсных штаммов ЭВ с известным серотипом, повсеместное введение в практику ПЦР и автоматизация секвенирования по Сэнгеру существенно упростило идентификацию энтеровирусов. «Золотым стандартом» в области молекулярного типирования ЭВ считается определение нуклеотидной последовательности области генома, кодирующей капсидный белок VP1 [100]. Полипептид VP1 содержит аминокислотные последовательности, определяющие серотип вируса, и является главным рецепторным локусом вириона [26]. Это наиболее вариабельный белок энтеровирусной оболочки [85]. Помимо прочего он несёт домен, кодирующий рецептор, ответственный за присоединение к клетке, причём у полиовирусов рецептор отличается от других энтеровирусов [119]. Путём секвенирования участка генома VP1 и сравнения полученной нуклеотидной последовательности с другими последовательностями, содержащимися в базе данных GenBank, возможно достаточно точное определение серотипа энтеровируса за короткий срок. В работах Oberste M.S. и др. [156, 157] была показана 100%-ная корреляция между серотипами энтеровирусов, определёнными с помощью реакции нейтрализации специфическими сыворотками и секвенирования участка генома VP1. Этот участок был признан наиболее подходящим для молекулярного типирования. Область генома VP2 также кодирует капсидный белок, испытывающий давление со стороны иммунной системы, как и VP1, однако она не столь специфична и не позволяет дифференцировать все серотипы ЭВ [82]. С помощью секвенирования были идентифицированы новые серотипы энтеровирусов, ранее неизвестные

исследователям. Предполагается, что штаммы, имеющие по крайней мере 75% идентичности по участку генома VP1 и 88% идентичных аминокислот, относятся к одному серотипу [79]. Однако попытки генотипирования обнаруженных в сточной воде ЭВ методом секвенирования могут не давать положительного результата из-за того, что в сточной воде зачастую присутствует более одного серотипа НПЭВ [60].

Тем не менее, молекулярное типирование также имеет свои подводные камни. Концентрация вирусной РНК в пробе обычно слишком мала для секвенирования, поэтому для увеличения титра вируса образец предварительно пассируют в клеточной культуре, обычно RD, как требует протокол ВОЗ. Но когда в образце присутствует смесь ЭВ вида В и С, преимущество в размножении имеют вирусы вида В, и без предварительного разделения смеси даже с помощью молекулярного метода определяются только они [97]. Для преодоления этого недостатка был разработан метод выделения ЭВ непосредственно из фекального материала: вложенная ПЦР (RT-nested PCR) [154]. Сложность задачи состояла в том, что амплификация варибельного участка генома VP1 требует вырожденных инозин-содержащих праймеров, а это зачастую приводит к наработке неспецифических продуктов амплификации вместо целевых. Гибридные праймеры (одновременно консенсусные и вырожденные) позволяют обойти эту проблему. Но и при применении данного метода стоит учитывать, что отрицательный образец, тестированный с использованием праймеров 224, 222, AN 89 и AN88, может содержать ЭВ, который можно обнаружить, если протестировать продукт первого раунда ПЦР с видоспецифичными праймерами [97].

Ещё одна сложность молекулярного типирования заключается в том, что серотип вируса является его фенотипической чертой и, как каждый фенотип, подвергается давлению отбора. Исследования свидетельствуют, что антитела, выработка которых была индуцирована старыми штаммами определённого серотипа, могут быть не эффективны против современных штаммов того же серотипа [85]. Небольших нуклеотидных замен в капсидном участке генома

достаточно, чтобы изменить антигенные свойства вируса, но недостаточно, чтобы считать его отдельным серотипом. Некоторые штаммы ЭВ проявляют дуализм по антигенным свойствам, нейтрализуясь антителами одновременно к двум различным серотипам [68]. Место подобных штаммов в классификации ЭВ неясно, поскольку каждый штамм должен относиться лишь к одному серотипу [97].

Помимо определения серотипа проводят филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выделенных штаммов. При наличии полных данных таким образом можно установить источник инфицирования, проследить связь между предполагаемым источником инфекции и другими заболевшими, а также выявить территорию, откуда произошёл занос вируса.

Как традиционные вирусологические методы диагностики ЭВИ, так и современные молекулярно-биологические не лишены недостатков. У вирусологических методик это длительность исследования, трудоёмкость, возможность выявления не всего спектра серотипов энтеровирусов, перекрёстные реакции и токсичность некоторых сывороток, используемых в реакции нейтрализации. Молекулярно-генетические методы требуют дорогостоящего оборудования и материалов, высокой квалификации персонала, нуждаются в строгом разделении этапов исследования для предотвращения случайной контаминации, неэффективны в случаях полиморфной ЭВИ [20].

Заключение

Одной из главных проблем в изучении энтеровирусов является их высокая генетическая изменчивость, которая в процессе эволюции привела к появлению большого числа серотипов данных вирусов. Многообразие возбудителей приводит к разнообразию клинических форм заболеваний. Хотя в большинстве случаев инфицирование проходит без клинических проявлений, энтеровирусы способны вызывать такие заболевания, как энтеровирусный менингит, увеит, инфекционный миокардит, перикардит, панкреатит, менингоэнцефалит и острый вялый паралич. Бессимптомное носительство, высокая контагиозность, способность длительно сохраняться в водных объектах, отсутствие

специфической профилактики являются причинами возникновения массовых вспышек энтеровирусной инфекции по всему миру. В XX веке главной угрозой здоровью населения со стороны энтеровирусов являлся полиовирус, однако с тех пор как в 1988 г. ВОЗ поставила перед собой цель ликвидировать полиомиелит, в настоящее время это заболевание не представляет глобальной угрозы для человечества. Однако место полиовирусов в человеческой популяции занимают энтеровирусы других серотипов.

Несмотря на то, что за годы изучения в научной литературе накоплены знания про строение энтеровирусов, механизм поражения клеток, пути передачи и клинические проявления энтеровирусной инфекции, остаются невыясненными особенности циркуляции энтеровирусов на территориях Российской Федерации, в том числе региона. Недостаточно сведений о распространённости неполиомиелитных энтеровирусов среди детей из закрытых детских коллективов. Также недостаточно информации об обнаружении энтеровирусов разных типов и генотипов у детей из семей мигрантов, прибывших на территории РФ из неблагополучных по полиомиелиту стран. В связи с усилением миграционных процессов между странами СНГ создается возможность импортирования и последующего распространения на территориях региона энтеровирусов типов и генотипов, ранее на них не циркулировавших.

Решение этих проблем определило цель и задачи данного исследования.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН «Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». На базе этой научно-исследовательской лаборатории функционирует вирусологическая лаборатория Санкт-Петербургского Регионального центра (СПб РЦ) по надзору за полиомиелитом и острыми вялыми параличами. Эта лаборатория одновременно является Субнациональной лабораторией Всемирной организации здравоохранения, ежегодно аккредитуется ВОЗ на основании выполнения профессионального теста и участвует в реализации Программы ликвидации полиомиелита. Исследование проводилось с 2012 по 2017 год. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (заключение Этического комитета № 21/4 от 19.10.2012).

Региональный центр курирует 14 административных территорий: 11 территорий Северо-Западного федерального округа (г. Санкт-Петербург, Республики Карелия и Коми, Ленинградская, Архангельская, Мурманская, Вологодская, Псковская, Новгородская, Калининградская области, Ненецкий автономный округ), одна территория Центрального федерального округа (Костромская область) и две территории Приволжского федерального округа (Саратовская и Нижегородская области). Общая численность населения курируемых территорий более 20 млн человек.

2.1. Материалы исследования

Для анализа заболеваемости острым вялым параличом на территориях, курируемых СПб РЦ, в 2010-2017 гг. были использованы формы федерального государственного статистического наблюдения № 1 и 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (месячная и годовая).

Для анализа заболеваемости энтеровирусной инфекцией на территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг. были использованы форма федерального государственного статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных

и паразитарных заболеваниях» и документация для подтверждения свободного от полиомиелита статуса территорий.

Проанализирована ежегодная документация, и получены сведения о заболеваемости разными клиническими формами энтеровирусной инфекции на 9 территориях СПб РЦ: 1669 случаев энтеровирусного менингита и 2424 случая экзантемных форм ЭВИ.

В лаборатории СПб РЦ исследовали фекальный материал от:

- больных с первичным диагнозом «острый вялый паралич» в возрасте до 15 лет;
- больных энтеровирусной инфекцией;
- контактных с больными ОВП лиц в возрасте до 5 лет;
- здоровых детей в возрасте до 5 лет, прибывших из эндемичных по полиомиелиту территорий и обратившихся за медицинской помощью в ЛПУ;
- здоровых детей из закрытых детских коллективов в возрасте до 5 лет.

Также исследовались предварительно концентрированные пробы сточной воды.

Эффективность вирусологической диагностики в большой степени зависит от правильного и своевременного сбора клинических проб, а также от соблюдения оптимальных условий их транспортировки в лабораторию. Все процедуры проводились в соответствии с рекомендациями ВОЗ, соответствующими Санитарными правилами и методическими указаниями.

Клинический материал собирался и направлялся в Региональный центр специалистами ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии». Пробы фекалий от больных ОВП забирали в ранние сроки (до 14 дней) от начала паралича. Так как содержание вируса в фекалиях может колебаться, от каждого больного брали по 2 пробы фекалий (около 8г. каждая) с интервалом в 24–48 часов. От больных ЭВИ, контактных и здоровых детей брали по одной пробе фекалий. Пробы помещали в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой. После сбора пробы хранились в холодильнике, если они транспортировались в вирусологическую лабораторию в течение 72 часов после забора. Если нет, то пробы замораживали

при -20°C и пересылали в замороженном виде. Доставка проб осуществлялась в термоконтейнере с хладоэлементами в течение не более 72 часов от даты забора.

Все выделенные полиовирусы отправлялись в Национальную лабораторию в «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН (г. Москва) для внутритиповой дифференциации (ВТД).

Общее количество проб из различных источников, исследованных в лаборатории СПб РЦ в течение 6 лет, представлено в таблице 2.

Таблица 2

Количество проб, исследованных в лаборатории СПб РЦ в 2012-2017 гг.

<i>Источник пробы</i>	<i>Количество проб</i>
Больные ОВП и контактные лица	635
Больные ЭВИ	371
Дети из неблагополучных территорий	712
Здоровые дети СЗФО	264
Сточная вода	273
Всего	2255

Пробы фекалий от больных с первичным диагнозом «острый вялый паралич» исследуются только в вирусологических лабораториях Региональных центров. В Национальной лаборатории исследуется материал от приоритетных («горячих») случаев, который поступает напрямую в эту лабораторию из вирусологических лабораторий ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии».

Пробы фекалий от больных энтеровирусной инфекцией с диагнозами «энтеровирусная инфекция», «энтеровирусный менингит», «экзантема полости рта и конечностей» и другие первоначально поступают в ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» соответствующей территории, где они исследуются методом ПЦР и/или вирусологическим методом. В лабораторию Регионального центра на ретестирование или идентификацию поступает часть положительных проб в виде изолятов вируса либо исходный биологический материал. После расшифровки серотипа энтеровирусов эти данные использовались специалистами ФБУЗ для

заполнения документации для подтверждения свободного от полиомиелита статуса территорий.

Пробы от здоровых детей до пяти лет, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту территорий, исследуются только в Субнациональных лабораториях ВОЗ по диагностике полиомиелита Региональных центров, поскольку есть вероятность содержания в них полиовируса дикого типа или вакцинородственных полиовирусов. На исследование направляются преимущественно пробы от детей, обратившихся в учреждения здравоохранения или поступающих в детские дошкольные учреждения (ДДУ).

Пробы фекалий от здоровых детей были собраны в закрытых детских коллективах четырёх территорий СЗФО: 164 пробы было взято у детей, проживающих в домах ребёнка в Новгородской, Калининградской областях и г. Санкт-Петербурге. 100 проб фекалий было взято у детей, посещающих ДДУ Ненецкого автономного округа.

Пробы сточной воды были собраны специалистами ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» соответствующей территории, где они были исследованы методом ПЦР и/или вирусологическим методом. В лабораторию Регионального центра на ретестирование или идентификацию отправлялась часть положительных проб в виде изолятов вируса либо концентрата сточной воды.

Был проведён анализ ежегодной документации для подтверждения свободного от полиомиелита статуса 14 территорий СПб РЦ в 2012-2017 гг. Обобщены данные по выделению и идентификации полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов различных типов от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды. От больных ЭВИ был выделен и идентифицирован 1791 штамм энтеровирусов различных серотипов. Из проб сточной воды было выделено и идентифицировано 704 штамма энтеровирусов различных серотипов.

Было проведено секвенирование участка генома VP1 118 штаммов энтеровирусов, выделенных в лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций из материала от больных ОВП, детей из групп риска, больных

энтеровирусной инфекцией, а также из проб сточной воды.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Вирусологический метод исследования

Пробоподготовка и выделение ЭВ осуществлялись в соответствии с рекомендациями ВОЗ «Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита» [48] и МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции» [65].

Для приготовления 20% фекальной суспензии пробы фекалий обрабатывались фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с раствором антибиотиков и хлороформом. Хлороформ позволяет удалить бактерии, грибки, цитотоксические липиды, разъединить вирусные агрегаты. Энтеровирусы не чувствительны к хлороформу. 2 г пробы соединяли с 10 мл ФСБ, 1 мл хлороформа и 1 г стеклянных бусин, тщательно встряхивали и центрифугировали 20 мин при 1500g в центрифуге с охлаждением.

Полиовирусы выделяли на двух клеточных культурах: RD и L20B по алгоритму, рекомендуемому ВОЗ [48]. Непوليوмиелитные энтеровирусы выделяли из проб фекалий на двух перевиваемых культурах клеток: Нер2 и RD. В клетках RD (рабдомиосаркома человека) размножается широкий спектр НПЭВ: вирусы ЕСНО, некоторые вирусы CVA (за исключением CVA1, A19, A22), энтеровирусы 68—71, иногда вирусы CVB. В клетках Нер-2 (Cincinnati) размножаются вирусы CVB, которые плохо размножаются в культуре RD. Для исключения полиовирусов все пробы проходили пассажи на культуре клеток L20B (модифицированные мышинные фибробласты, имеющие на своей поверхности рецепторы к вирусам полиомиелита), которые демонстрируют специфическое цитопатогенное действие (ЦПД) при заражении полиовирусом. Клеточные линии получали на регулярной основе из Национальной лаборатории по диагностике полиомиелита на базе ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова» РАН (г. Москва).

Клетки RD культивировали в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот с добавлением 7% эмбриональной телячьей сыворотки и

раствора антибиотиков. Клетки Her2 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и раствора антибиотиков. Раствор антибиотиков добавлялся из расчёта 100 ЕД пенициллина и 100 мкг стрептомицина в 1 мл питательной среды. Клетки выращивали в пластиковых флаконах площадью 25 см² или пробирках. Для исследований одной пробы использовали по 1 флакону каждой культуры или по 2 пробирки на один пассаж. По 1 флакону/пробирке с каждым типом клеток оставляли незаражёнными в качестве отрицательного контроля.

Во флакон с сформировавшейся культурой клеток вносили 0,5 мл (0,2 мл для пробирки) суспензии, содержащей фекальный материал, и инкубировали при 36°C. Проба считалась содержащей НПЭВ, если наблюдалось характерное для энтеровирусов ЦПД: округление клеток, отслаивание от ростовой поверхности. Культуру клеток ежедневно просматривали под инвертированным микроскопом в течение 5 дней при отсутствии признаков ЦПД, либо до распространения ЦПД на 75-100% клеточной культуры. После этого проводили второй пассаж: флакон с культурой клеток замораживали при -5°C, оттаивали и переносили 0,5 мл культуральной жидкости во флакон с чистой культурой клеток той же линии. Новую культуру наблюдали также в течение 5 дней до наступления ЦПД. Если ЦПД не отмечалось, проба считалась отрицательной. Если одна или обе культуры проявляли признаки ЦПД, проводили дополнительный пассаж на клетки линии L20В для исключения полиовируса. Из флакона с клетками после заморозки отбирали культуральную жидкость для хранения при -20°C.

Для идентификации выделенных штаммов полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов использовали реакцию нейтрализации с диагностическими моновалентными сыворотками производства ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН". Разведенные в 10⁻² и 10⁻³ суспензии исследуемых энтеровирусов смешивали в равных объёмах с сыворотками, иммунными к различным серотипам энтеровирусов. Смеси вируса и сывороток вносили в лунки планшета для микронейтрализации либо в пробирки и выдерживали 1 час при 36°C для связывания антител с вирусом. Затем к смесям

добавляли суспензию клеток либо вносили смесь в подготовленную пробирку с клетками, помещали в термостат при 36°C и ежедневно проверяли наличие ЦПД. Сыворотка, предупреждающая развитие ЦПД, указывала серотип вируса.

2.2.2.Молекулярно-биологический метод исследования

Секвенирование области генома VP1 является наиболее надёжным современным методом определения серотипа энтеровируса. Структурный белок VP1 играет ключевую роль в формировании антигенных свойств оболочки вируса и, как следствие, определяет его серотип. Полученная нуклеотидная последовательность сравнивается с полногеномными последовательностями штаммов ЭВ, предложенными Международным комитетом по таксономии вирусов (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, Picornaviridae Study Group - <http://www.picornastudygroup.com/>), на основании этого делается вывод о принадлежности вируса к тому или иному серотипу.

Секвенирование неполной области генома VP1 82 штаммов выделенных энтеровирусов проводилось совместно со специалистами референс-центра по мониторингу за ЭВИ на базе ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» в рамках договора о научном сотрудничестве. Секвенирование полной области генома VP1 36 штаммов выделенных энтеровирусов было проведено совместно с сотрудниками лаборатории биологии кишечных вирусов (*Unite de Biologie des Virus Enteriques*) Института Пастера в Париже, Франция.

Получение нуклеотидной последовательности полной области генома VP1 (850-930 н.н.)

Перед исследованием вирус был инактивирован при 70°C, культуральная жидкость была нанесена на ФТА-карту и высушена в боксе микробиологической безопасности. Для выделения РНК использовали набор High Pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics, France) согласно инструкции по применению.

Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции в объёме 18 мкл. 2 мкл выделенной РНК смешивали с 1 мкл Amorse Nепта N (100мМ), 0,5 мкл РНАзина (40ед/мкл), 2 мкл дитиотреитола (0,1М), 1 мкл

смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), 4 мкл 5-кратного ОТ-буфера, 1 мкл праймеров (random primers Hepta N), 1 мкл ревертазы (RT superscript II reverse transcriptase (200ед/мкл) производства Invitrogen) и 8,5 мкл деионизованной воды, свободной от РНКаз. Смесь инкубировали 10 мин при 25°C, затем 50 мин при 42°C, 5 мин при 95°C и 2 мин при 4°C.

Для амплификации целевых фрагментов участка генома VP1 применялась двухэтапная «вложенная» ПЦР (nested-PCR). В смесь для ПЦР входили: 2 мкл кДНК, 5 мкл 10-кратного буфера Taq MgCl₂, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 1 мкл смеси дНТФ (10 мМ), 41,5 мкл деионизованной воды и 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы (Taq DNA pol MP Biomedicals (5ед/мкл)). Смесь инкубировали в термоциклере по схеме:

2 мин при 95°C	} x 35 циклов
30 сек при 95°C	
30 сек при 45°C	
1 мин 10 сек при 72°C	
10 мин при 72°C	

На первом этапе реакции использовалась пара праймеров:

	<i>Название</i>	<i>Позиция</i>	<i>Последовательность 5' - 3'</i>
F	AMTH	2204-2223	GCIATGYTIGSIACICAYVT
R	GDCL	3714-3695	ARIABICCCRCARTCICC

Данные праймеры были разработаны на основании литературных данных [154] и модифицированы [74]. Полученный участок ДНК длиной 1510 п.н. использовался во втором этапе реакции с праймерами, предложенными Nix et al [154]:

	<i>Название</i>	<i>Позиция</i>	<i>Последовательность 5' - 3'</i>
F	224	2200-2219	GCIATGYTIGSIACICAYVT
R	222	2969-2951	CICCI GGIGGIAYRWACAT

Получение нуклеотидной последовательности неполной области генома VP1 (375 п.н.)

Для выделения РНК использовался набор реагентов РИБО-преп (АмплиСенс, Россия) согласно инструкции по применению. Синтез кДНК на матрице РНК производили с использованием набора РЕВЕРТА-L (АмплиСенс,

Россия) согласно инструкции по применению.

ПЦР для получения целевых фрагментов участка генома VP1 проводили в два раунда [26]. В состав реакционной смеси входили: 5 мкл кДНК, 0,2 мкл ДНК-полимеразы в комплекте с 5-кратным ПЦР-буфером, содержащим 15 мМ MgCl₂; 2,5 мкл смеси дНТФ; 5 мкл TE-буфера; 12,1 мкл деионизованной воды, свободной от РНКаз; 0,2 мкл праймеров. В первом раунде ПЦР использовалась Taq полимеразы, во втором - Taq-F полимеразы.

В реакции использовались следующие пары праймеров, предложенные Nix et al [154]:

	<i>Название</i>	<i>Позиция</i>	<i>Последовательность 5'-3'</i>
Первый раунд ПЦР			
F	224	2200-2219	GCIATGYTIGSIACICAYVT
R	222	2969-2951	CICCIGGIGGIAYRWACAT
Второй раунд ПЦР			
F	AN89	2602-2627	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
R	AN88	2977-2951	ACTTGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

Смесь инкубировали в термоциклере по схеме:

Первый раунд ПЦР:

95°C – 1 мин
95°C – 10 сек
42°C – 10 сек
60°C – 10 сек
60°C – 5 мин

} * 40 циклов

Второй раунд ПЦР:

95°C – 15 мин
95°C – 10 сек
60°C – 10 сек
72°C – 10 сек
72°C – 5 мин

} * 42 цикла

Детекция продуктов амплификации осуществлялась в агарозном геле в ультрафиолетовом свете.

Секвенирование генома выделенных штаммов проводили по двум цепям с помощью секвенаторов ABI Prism 3100 (производство Applied Biosystems, США) и «GenomeLab GeXP» (производство Beckman Coulter, США) методом Сэнгера

[173]. Пробоподготовка продуктов амплификации перед секвенированием осуществлялась согласно рекомендациям производителя.

2.2.3. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA v.5.2, сравнивая полученную последовательность с последовательностями генома энтеровирусов, представленными в базе данных NCBI (GenBank), путём использования онлайн-инструмента BLAST. Последовательности для сравнения подбирали, исходя из региона и года выделения штаммов, выравнивали с помощью алгоритма Muscle. Филогенетические деревья строили методом maximum likelihood. Оценку надёжности филогенетического дерева выполняли путём бутстрэп-анализа с использованием 1000 случайных выборок. Достоверно установленными узлами считали те, для которых значение бутстрэп-анализа превышало 70.

2.2.4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка выполнялась с помощью программы MS Excel v. 2010 согласно общепринятым методикам [17]. Проверка статистических гипотез о разности выборок осуществлялась с помощью t-критерия Стьюдента и критерия согласия Пирсона (хи-квадрат). Уровень значимости p принимали равным 0,05.

Коэффициент корреляции вычислялся по методу Пирсона. Значение коэффициента корреляции от 0 до 0,3 считали слабой прямой связью, от 0,3 до 0,7 – средней, от 0,7 до 1 – сильной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА III. ПОЛИОВИРУСЫ И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА И КОНТАКТНЫХ ЛИЦ

На территориях СПб РЦ надзор за случаями острого вялого паралича у детей до 15 лет ведётся с 1998 года. Под синдромом острого вялого паралича понимают остро (менее, чем за 7 дней) развившееся состояние слабости (вялости) любой части тела у ребёнка до 15 лет или паралитическое заболевание у лиц любого возраста при подозрении на полиомиелит. При регистрации случаев ОВП и заболеваний полиомиелитом учитывают определения случаев в соответствии с Международной классификацией болезней 10 пересмотра (МКБ 10), перечень которых приведен в Приложении 1 СП 3.1.2951-11 «Профилактика полиомиелита» [38].

Синдром ОВП может наблюдаться при многих патологиях инфекционного и неинфекционного генеза. К наиболее часто встречающимся нозологическим формам данного синдрома относятся:

- острый паралитический полиомиелит;
- полинейропатии (включая синдром Гийена-Барре);
- миелиты;
- мононейропатии (в том числе травматические);
- опухоли спинного мозга [64].

Данные о количестве проб от больных с первичным диагнозом «острый вялый паралич» и контактных с ними лиц, поступивших в лабораторию СПб РЦ, и выделению ПВ и НПЭВ из этих проб представлены в табл. 3. В результатах собственного исследования не показаны приоритетные («горячие») случаи, поскольку согласно МУК 4.2.2410—08 [32] такие случаи обследуются в Национальной лаборатории (НЛ) по диагностике полиомиелита в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАН. Определение приоритетного («горячего») случая острого вялого паралича дано в Приложении 2 вышеупомянутых методических рекомендаций.

Таблица 3

Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов у больных с первичным диагнозом ОВП и контактных лиц на территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

Год	Число проб от больных ОВП	Число проб от контактных лиц	Число выделенных полиовирусов абс/%	Число выделенных неполиомиелитных энтеровирусов абс/%
2012	108	9	3 / 2,6%	8 / 6,8%
2013	94	2	9 / 9,4%	2 / 2,1%
2014	84	7	2 / 2,0%	4 / 4,0%
2015	116	7	14 / 11,3%	7 / 5,6%
2016	84	6	0	2 / 2,2%
2017	108	10	3 / 2,5%	3 / 2,5%
Всего	594	41	31 / 4,9 %	26 / 4,1 %

Ежегодно на территориях СПб РЦ выявляли 7-8 «горячих» случаев, и от 40 до 60 случаев ОВП. Исследовали около ста проб фекалий от больных с синдромом ОВП и контактных лиц в год. Полиовирусы в среднем выделялись в 4,9% проб, неполиомиелитные энтеровирусы в 4,1% проб. В 2015 г. число выделенных полиовирусов было статистически достоверно выше, чем в другие годы ($p < 0,05$), поскольку от больных чаще выделяли смеси серотипов полиовирусов, в 2016 г. полиовирусы не были выделены совсем. Все выделенные полиовирусы прошли внутритиповую дифференциацию в НЛ, по результатам которой были отнесены к вакцинным штаммам. Процент выделения неполиомиелитных энтеровирусов был выше всего в 2012 (6,8%) и 2015 (5,6%) годах, ниже всего – в 2013 (2,1%) и 2016 (2,2%) годах. Статистически значимых различий в выделении НПЭВ в разные годы наблюдения выявлено не было.

Каждый субъект РФ имеет определённый расчётный показатель выявления и регистрации случаев ОВП в год, который зависит от числа детей в возрасте до

15 лет, проживающих на данной территории (не менее 1,0 на 100 тыс. детей в возрасте до 15 лет). Этот критерий является индикатором способности страны (субъекта) не пропустить заболевание полиомиелитом. Расчётное число ожидаемых случаев ОВП в год для территорий СПб РЦ представлено в табл. 4. Самое большое расчётное число случаев ОВП в год среди территорий СПб РЦ в Санкт-Петербурге, которое менялось от 5 случаев в 2010 г. до 7 случаев в 2016 г., Нижегородской (4 случая в 2011 и 2012 гг., 5 случаев в остальные годы) и Саратовской областях (4 случая в год). Самое маленькое – в Ненецком автономном округе, где должно быть выявлено не менее одного случая ОВП за 10 лет. Невыполнение территорией расчётного показателя может зависеть либо от низкой выявляемости случаев ОВП в лечебных учреждениях, либо из-за того, что не все первичные диагнозы окончательно классифицируются как ОВП Комиссией по диагностике полиомиелита и ОВП.

Был проведён ретроспективный анализ числа случаев ОВП по первичному диагнозу за 8 лет на 14 территориях, курируемых СПб РЦ с 2010 по 2017 гг. Всего за этот период было зарегистрировано 467 случаев с первичным диагнозом ОВП, включая «горячие» случаи (табл. 4). Больше всего случаев с первичным диагнозом ОВП было зарегистрировано в Нижегородской области (105 случаев) и в Санкт-Петербурге (81 случай). Случаи ОВП включаются в отчет по формам федерального государственного статистического наблюдения № 1 и 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (месячная, годовая) только после подтверждения диагноза комиссией по диагностике полиомиелита и ОВП субъекта РФ и Национальной Комиссией по диагностике полиомиелита и ОВП Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [38]. Окончательный диагноз устанавливается на основании анализа и оценки медицинской документации. Не все первично зарегистрированные случаи окончательно классифицируются как ОВП.

Таблица 4

Количество первично зарегистрированных случаев ОВП и случаев ОВП по данным формы № 1 на 14 территориях СПб РЦ в 2010-2017 гг.

№	Территория	Расчётное кол-во случаев ОВП/год	Кол-во случаев ОВП по данным операт. информации	Кол-во случаев ОВП по данным ф1
1	г. Санкт-Петербург	7	81	73
2	Республика Карелия	1	18	10
3	Республика Коми	2	21	19
4	Архангельская обл.	2	31	19
5	НАО	0,1	3	1
6	Вологодская обл.	2	37	24
7	Мурманская обл.	1	28	23
8	Ленинградская обл.	2	28	19
9	Новгородская обл.	1	23	10
10	Псковская обл.	1	16	9
11	Костромская обл.	1	20	11
12	Калининградская обл.	1	16	8
13	Саратовская обл.	4	40	31
14	Нижегородская обл.	5	105	54
	Итого	30,1	467	311

Выполнение расчётного показателя случаев ОВП на территориях СПб РЦ по годам представлены в табл. 5. Только Мурманская область ежегодно выполняла расчётный показатель случаев ОВП. Хуже всего дело обстояло на трёх территориях: Республика Карелия, Калининградская и Саратовская области, на которых в течение трёх или четырёх лет из восьми рассматриваемых расчётный показатель выполнен не был.

Невыполнение расчётного числа случаев ОВП по форме №2 по годам,
2010-2017 гг.

№	Территория	Невыполнение расчётного количества случаев ОВП, год
1	г. Санкт-Петербург	2011
2	Республика Карелия	2014, 2016, 2017
3	Республика Коми	2013
4	Архангельская обл.	2012, 2014
5	НАО	
6	Вологодская обл.	2017
7	Мурманская обл.	-
8	Ленинградская обл.	2017
9	Новгородская обл.	2013
10	Псковская обл.	2011, 2015
11	Костромская обл.	2010, 2015
12	Калининградская обл.	2013, 2016, 2017
13	Саратовская обл.	2010, 2013, 2015, 2017
14	Нижегородская обл.	2016

Всего за восьмилетний период наблюдения неполиомиелитные энтеровирусы были выделены от 21 больного с первичным диагнозом ОВП. Чаще всего это были больные с диагнозом полирадикулонейропатия (6 случаев, 28,6%). По три случая приходилось на энцефаломиелит и монопарез. В трёх случаях диагноз звучал как «синдром ОВП», без уточнений. В одном случае был поставлен первичный диагноз «ОВП, артралгия». В двух случаях больные имели первичный диагноз «нейропатия», ещё по одному случаю пришлось на синдром Гийена-Барре, парапарез и миелопатию.

ОВП с выделением энтеровирусов чаще всего регистрировали среди детей до 5 лет. Из 21 случая ОВП с выделением НПЭВ 16 случаев заболевания было отмечено у детей от 1 года 8 месяцев до 4 лет, 5 случаев – у детей 6-15 лет. У детей до года с синдромом ОВП энтеровирусы не выделялись.

В таблице 6 представлены серотипы энтеровирусов, выделенные на

территориях СПб РЦ от больных острыми вялыми параличами за 8 лет. Число случаев ОВП с выделением НПЭВ не совпадает с числом выделенных штаммов энтеровирусов, поскольку ЭВ не всегда выделялись из обеих проб. Некоторые ЭВ были выделены только из одной пробы. Выделение НПЭВ из материала от больных с синдромом ОВП на территориях не было равномерным. Так, на ряде территорий (Республики Карелия и Коми, Архангельская и Костромская области, НАО) за весь период наблюдения НПЭВ от больных с синдромом ОВП не были выделены. На трёх территориях, в том числе в Санкт-Петербурге, ЭВ были зафиксированы в материале от одного случая ОВП на каждой из территорий. Больше всего энтеровирусов за 8 лет было выделено от больных с синдромом ОВП из Нижегородской области, что прежде всего связано с обследованием значительно большего числа случаев с первичным диагнозом ОВП (105 случаев) по сравнению с другими территориями СПб РЦ.

Таблица 6

Серотипы НПЭВ, выделенные от больных с синдромом острого вялого паралича на территориях СПб РЦ в 2010-2017 гг.

№	Территория	Число случаев ОВП с выделением НПЭВ	Выделенные штаммы НПЭВ (год)
1	г. Санкт-Петербург	1	2 Соx А2 (2015)
2	Ленинградская обл.	2	2 Соx В1-6 (2010), 2 NPEV (2016)
3	Новгородская обл.	3	2 E11 (2012), 2 NPEV (2012), 2 E6 (2015)
4	Псковская обл.	1	2 Соx В1-6 (2010)
5	Мурманская обл.	2	2 Соx А21 (2014), 1 NPEV (2015)
6	Вологодская обл.	3	1 Соx А (2011), 1 СоxА10 (2012), 2 СоxВ1-6 (2012)
7	Калининградская обл.	1	2 Соx В5 (2014)
8	Нижегородская обл.	6	2 Соx В3 (2011), 1 СоxА4 (2011), 2 E30 (2013), 2 СоxА16 (2015), 3 NPEV (2017)
9	Саратовская обл.	2	2 ECHO 22 (2011), 1 NPEV (2012)
	Итого	21	36

Всего из проб материала от 21 больного с синдромом ОВП было выделено 36 штаммов энтеровирусов, из них 9 не удалось типировать ни в нашей

лаборатории, ни в Национальной лаборатории, куда направляются все изоляты полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от этой категории больных.

Спектр выделенных от больных с первичным диагнозом ОВП энтеровирусов был разнообразным (табл. 6). На пяти территориях из четырнадцати в материале от пяти больных были обнаружены ЭВ CVB. ЭВ ЕСНО были выявлены у четырёх больных на трёх территориях. ЭВ CVA разных серотипов – на четырёх территориях у шести больных. В целом энтеровирусы CVA и CVB различных серотипов были выделены примерно в равном количестве (25,0% и 27,8% положительных проб соответственно). Вирусы ЕСНО содержались в 22,2% положительных проб. Часть ЭВ (25%) осталась неидентифицированной (рис. 3.1).

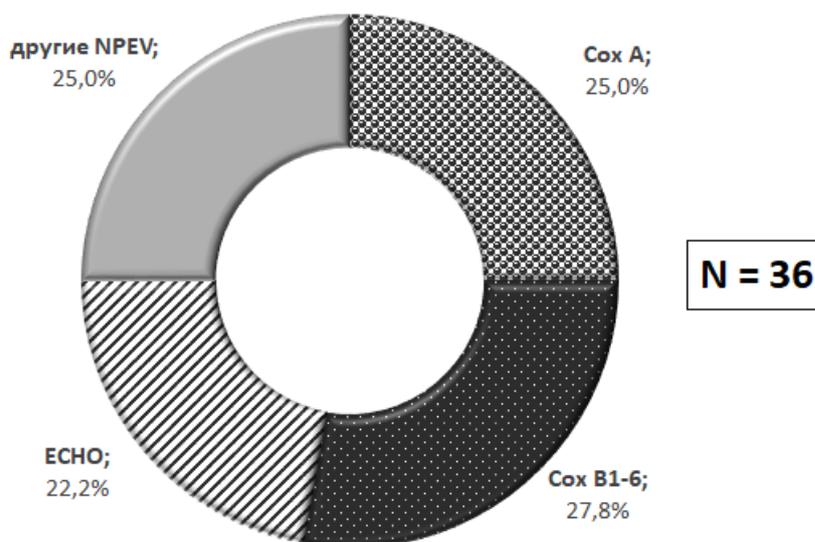


Рис. 3.1. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных с синдромом ОВП в 2010-2017 гг.

Энтеровирусы большинства серотипов, выделенных от больных с синдромом острого вялого паралича, широко циркулируют на территориях СПб РЦ. К ним относятся ЭВ CVB, CAV16, ЕСНО 6, 11 и 30. В 2013 г. от больного с синдромом ОВП из Нижегородской области был выделен ЭВ ЕСНО 30. В тот год в Нижегородской области, как и на многих территориях региона, имел место

значительный подъём заболеваемости энтеровирусной инфекцией, в том числе энтеровирусным менингитом, вызванный ЭВ ЕСНО 30 нового для России генотипа h. Энтеровирус ЕСНО 11 был выделен от больного с синдромом ОВП из Новгородской области в 2012 г. В этот год доля энтеровируса ЕСНО 11 составила 10,9% от всех энтеровирусов, выделенных от больных энтеровирусной инфекцией в регионе. ЭВ СVA4 в 2011 г. вызвал нейропатию обеих нижних конечностей у ребёнка из Нижегородской области. В этой области в тот год от больных ЭВИ было выделено три штамма СVA4. ЭВ CVB постоянно обнаруживаются в материале от больных энтеровирусной инфекцией и пробах из окружающей среды, широко циркулируют на территориях СПб РЦ. Поэтому их выделение от больных с синдромом ОВП на половине территорий СПб РЦ закономерно.

Часть серотипов ЭВ, выделенных от больных с синдромом ОВП, встречается на курируемых территориях редко. Так, энтеровирус ЕСНО 22, выделенный от больного с синдромом ОВП из Саратовской области в 2011 г., был единственный раз детектирован в 2010 г. у двух больных энтеровирусной инфекцией в Мурманской области. В отношении ЭВ СVA следует сказать, что у больных с синдромом ОВП были обнаружены энтеровирусы как часто, так и редко встречающихся серотипов. Например, в 2015 г. от двухлетнего ребёнка с полинейропатией из Нижегородской области был выделен ЭВ СVA16, который часто выявляется у больных ЭВИ. Напротив, выделенный от больного с синдромом ОВП из Мурманской области в 2014 г. ЭВ СVA21 ранее не выделялся в регионе. Вирус этого серотипа ранее был обнаружен только однажды в 2013 г. у здорового ребёнка, прибывшего из Казахстана.

Таким образом, анализ выделения энтеровирусов из проб от больных с синдромом острого вялого паралича в сочетании с ретроспективным анализом показал, что в период с 2010 по 2017 гг. у больных с синдромом ОВП чаще всего выделялись энтеровирусы, циркулирующие на территориях СПб РЦ. Частота выделения энтеровирусов от больных с синдромом ОВП не была связана с подъёмами заболеваемости энтеровирусной инфекцией на территориях.

ГЛАВА IV. НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ БОЛЬНЫХ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Надзор за энтеровирусной инфекцией является одним из важных видов дополнительного надзора, проводящегося в рамках Программы ликвидации полиомиелита. Регистрация ЭВИ в РФ введена в 2006 г., до этого регистрировались и расшифровывались преимущественно крупные вспышки энтеровирусной инфекции. Регистрация случаев осуществляется в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [65]. Надзор за ЭВИ включает:

- мониторинг заболеваемости;
- наблюдение за циркуляцией энтеровирусов, включая результаты вирусологического исследования материала от больных ЭВИ и проб из объектов окружающей среды;
- оценку эффективности проводимых санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;
- прогнозирование эпидемической ситуации.

Выявление больных ЭВИ осуществляют специалисты лечебно-профилактических учреждений при всех видах оказания медицинской помощи. Регистрации подлежат только лабораторно подтверждённые случаи ЭВИ. Основными регистрируемыми формами заболевания являются энтеровирусный менингит и вирусная экзантема полости рта и конечностей, поскольку с лёгкими формами заболевания не всегда обращаются в ЛПУ.

4.1. Результаты вирусологического исследования проб фекалий от больных энтеровирусной инфекцией

Ежегодно на 14 территориях, курируемых СПб РЦ, исследовалось от 1560 до 5007 проб фекалий от больных энтеровирусной инфекцией (рис. 4.1). Всего за 6 лет ФБУЗ «Центрами гигиены и эпидемиологии» было исследовано 17710 проб. Больше всего материала на территориях было исследовано в 2013 (3625 проб) и 2017 (5007 проб) годах, что связано с подъёмами заболеваемости энтеровирусной

инфекцией на ряде территорий РФ. Полиовирусы в среднем были выделены в 0,3% проб, неполиомиелитные энтеровирусы - в 10,5% проб. Во всех случаях полиовирусы выделялись у детей, недавно привитых живой полиомиелитной вакциной. По результатам ВТД все полиовирусы принадлежали к вакцинным штаммам. НПЭВ выделялись значительно чаще, больше всего энтеровирусов было выделено в 2013 и 2014 гг., когда доля положительных проб составила 12,5% и 12,3% соответственно. Меньше всего – в 2012 г. (8,5%), когда ситуация по энтеровирусной инфекции была благополучной.

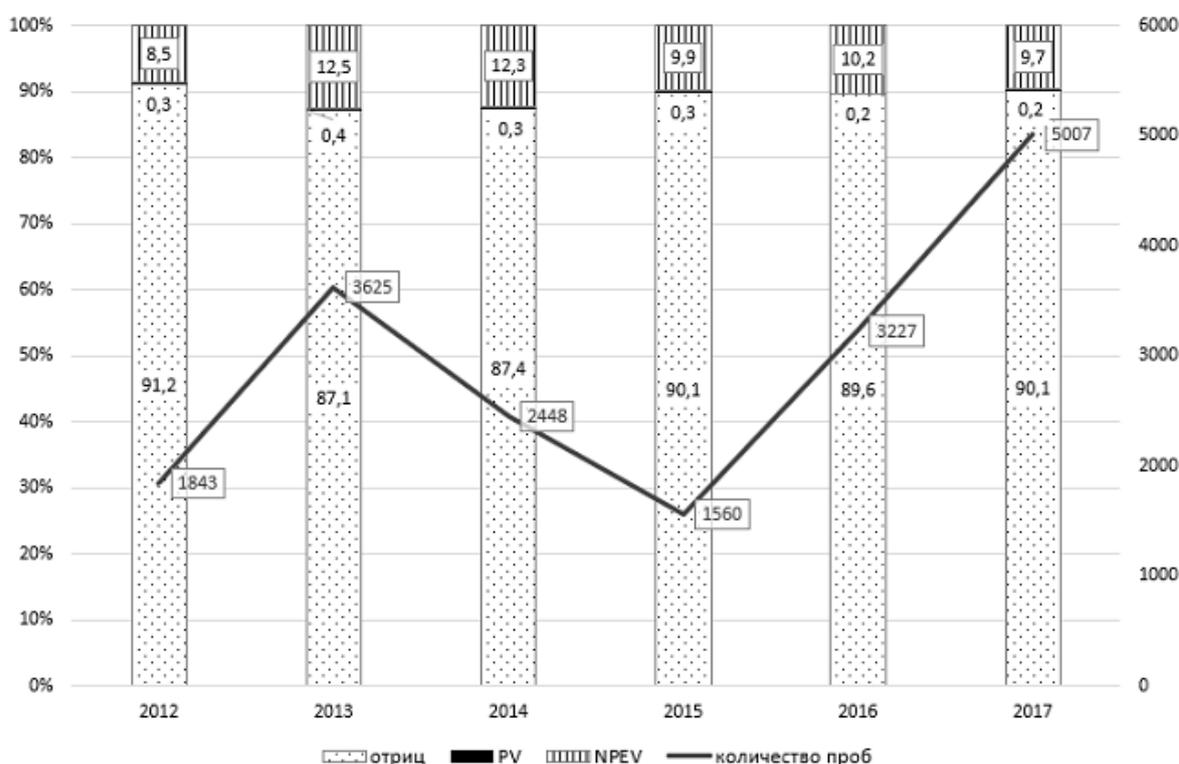


Рис. 4.1. Количество проб от больных ЭВИ, исследованных в ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» 14 территорий в совокупности в 2012-2017 гг.

В лабораторию СПб РЦ с курируемых территорий ежегодно направлялись положительные пробы от больных ЭВИ для подтверждения и идентификации энтеровирусов (табл. 7). Число проб от больных различными формами энтеровирусной инфекции, исследованных в лаборатории СПб РЦ, зависело от количества исследованного материала в лабораториях ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии». В годы подъёма заболеваемости ЭВИ на отдельных территориях

(2013 и 2016 гг.) количество поступающих в лабораторию проб увеличивалось примерно вдвое по сравнению с годами невысокой заболеваемости ЭВИ. Энтеновирусы в среднем были подтверждены в 46,4% проб.

Таблица 7

Выделение неполиомиелитных энтеновирусов из проб от больных энтеновирусной инфекцией, полученных лабораторией СПб РЦ для подтверждения и идентификации в 2012-2017 гг.

Год	Число проб от больных ЭВИ	Число выделенных энтеновирусов	Процент выделения НПЭВ
2012	40	18	45%
2013	112	57	50,9%
2014	51	18	35,3%
2015	29	14	48,3%
2016	97	47	48,5%
2017	42	18	42,8%
Всего	371	172	46,4%

Спектр энтеновирусов, выделявшихся от больных энтеновирусной инфекцией на территориях СПб РЦ, в разные годы не был одинаков. Так, в 2012 г. (рис. 4.2) от больных ЭВИ чаще всего выделялись разные серотипы ЭВ СVA (24,8%) и CVB (34,0%). Все ЭВ СVA, которые удалось типировать, относились к серотипу A16, начавшему активно циркулировать на территориях СПб РЦ с 2009 года. Серотипы ЭВ CVB в этом году, как в предыдущем и последующих, обуславливали преимущественно спорадические случаи энтеновирусного менингита. Довольно часто встречались энтеновирусы ЕСНО традиционных для территорий СПб РЦ типов 6, 7, 11, 13 и 30. На их долю суммарно приходилось 33,4%. EV71 был выделен лишь от одного больного (0,6%). В единичных случаях выделялись такие ЭВ, как ЕСНО 5, 14, 17, 25, 29 и EV 76.

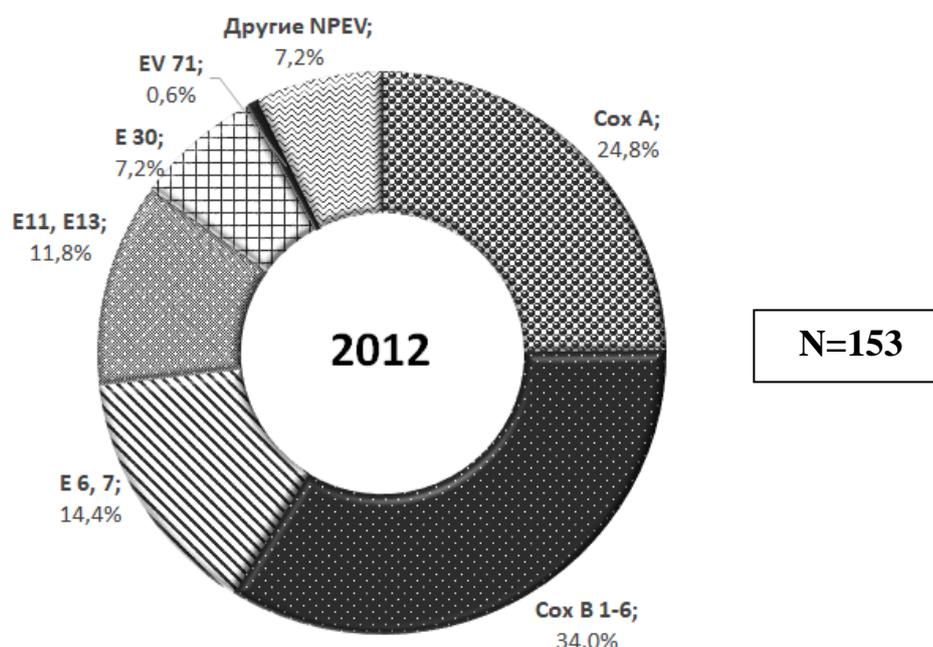


Рис. 4.2. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 13 территориях СПб РЦ в 2012 г.

В следующем, **2013** году лидирующим серотипом в этиологии энтеровирусной инфекции становится ЭВ ЕСНО 30 (рис. 4.3). Он выделялся от больных ЭВИ на 12 территориях, курируемых СПб РЦ. Суммарно было выделено 178 вирусов ЕСНО 30, что составило 39,2% от общего числа выделенных ЭВ и было статистически достоверно больше ($p < 0,05$), чем в другие годы наблюдения. Энтеровирус ЕСНО 30 генотипа h был импортирован в Россию в 2013 г. из Юго-Восточной Азии, что обусловило подъём заболеваемости ЭВИ на многих территориях РФ, в том числе в нашем регионе. Другие вирусы ЕСНО выделялись в небольших количествах (ЕСНО 6 – 7,5%; ЕСНО 11, 13 – 5,7%). Доля ЭВ СВВ была ниже, чем в 2012 г., но оставалась существенной, составив 26,4%. Доля вирусов СВА оказалась меньше, чем в предыдущем году, однако количественно их было выделено больше (57 в 2013 г. против 38 штаммов в 2012 г.). На территории четырёх областей циркулировал EV71, было выделено 23 штамма (5,1%). Ни до, ни после 2013 г. EV71 в таком количестве на территориях СПб РЦ не выявлялся. В единичных случаях были выделены ЭВ ЕСНО 2, 18 и EV70.

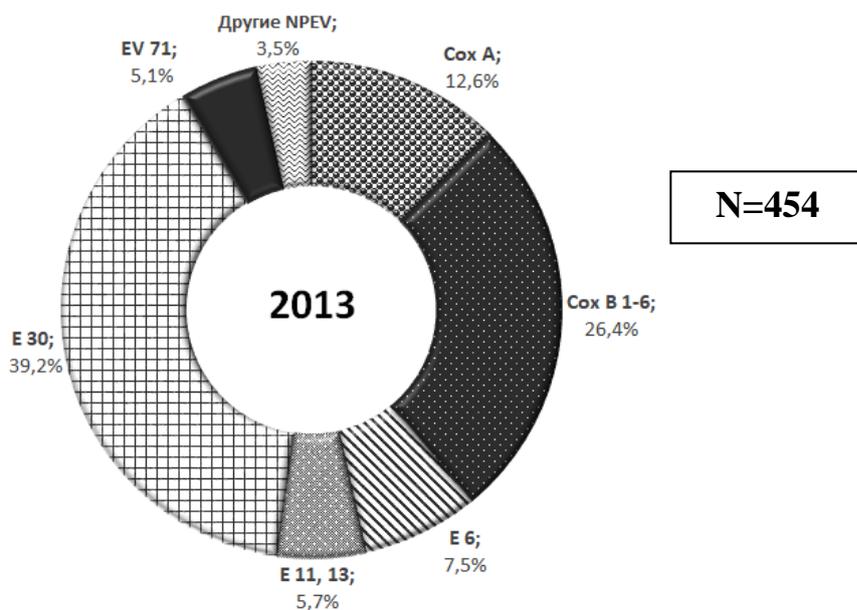


Рис. 4.3. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 13 территориях СПб РЦ в 2013 г.

В **2014** году ситуация по энтеровирусной инфекции улучшилась. Снизилась как общая заболеваемость, так и число исследованных проб и выделенных энтеровирусов (рис. 4.4). Основными этиологическими агентами ЭВИ стали вирусы CVB (54,7% среди всех выделенных энтеровирусов). ЭВ CVA стали циркулировать более широко по сравнению с предыдущим периодом: в 2014 г. их присутствие было отмечено на 10 территориях, курируемых СПб РЦ, тогда как в 2012 г. CVA были отмечены только на 5 территориях. Доля ЭВ ЕСНО 30 резко упала, от больных ЭВИ было выделено лишь 20 штаммов этого серотипа (6,7%). Вирусов ЕСНО других серотипов стало ещё меньше, чем в 2013г.: суммарная доля ЕСНО 6, 7, 11 и 13 составила лишь 4,7%. Проведённые противоэпидемические мероприятия позволили остановить распространение патогенного штамма EV71 в РФ, и в 2014 г. было выделено всего 6 штаммов этого вируса на двух наших территориях (2,0%). В единичных случаях были выделены другие ЭВ: ЕСНО 1, 14 и EV68.

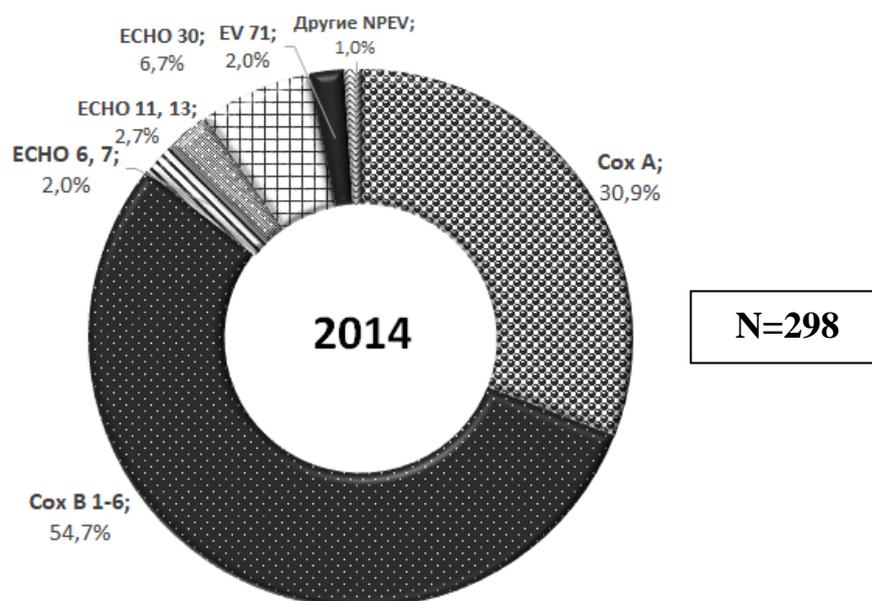


Рис. 4.4. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 13 территориях СПб РЦ в 2014 г.

2015 год отмечен низкой заболеваемостью ЭВИ и наименьшим выделением энтеровирусов от больных за рассматриваемый период. ЭВ CVB и CVA выделялись практически в равных долях (36,8% и 31,3% соответственно) (рис. 4.5). Кроме того, было выделено 9 штаммов EV71 (6,2%) и 4 штамма EV75. Энтеровирусы этого серотипа редко встречаются на территориях СПб РЦ. Помимо них было выделено по несколько штаммов ЕСНО 2, 3, 16, 18 и 25.

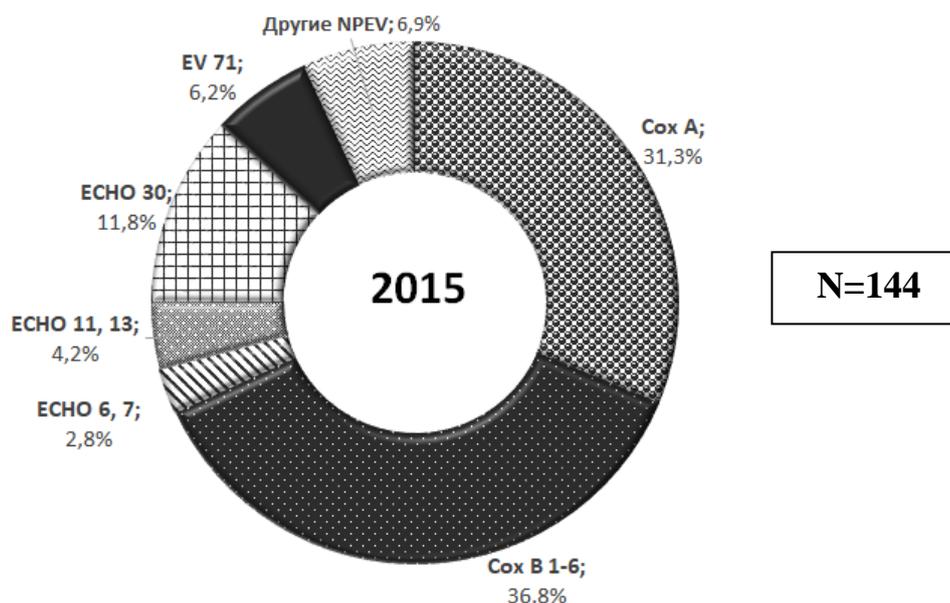


Рис. 4.5. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 13 территориях СПб РЦ в 2015 г.

В **2016** году лидирующую позицию заняли различные серотипы CVA (33,5%), ЕСНО 30 (21,7%) и CVB (18,6%) (рис. 4.6). Вирусы ЕСНО других серотипов (3, 6, 9, 11, 13, 16, 25) были обнаружены в 22,4% случаев.

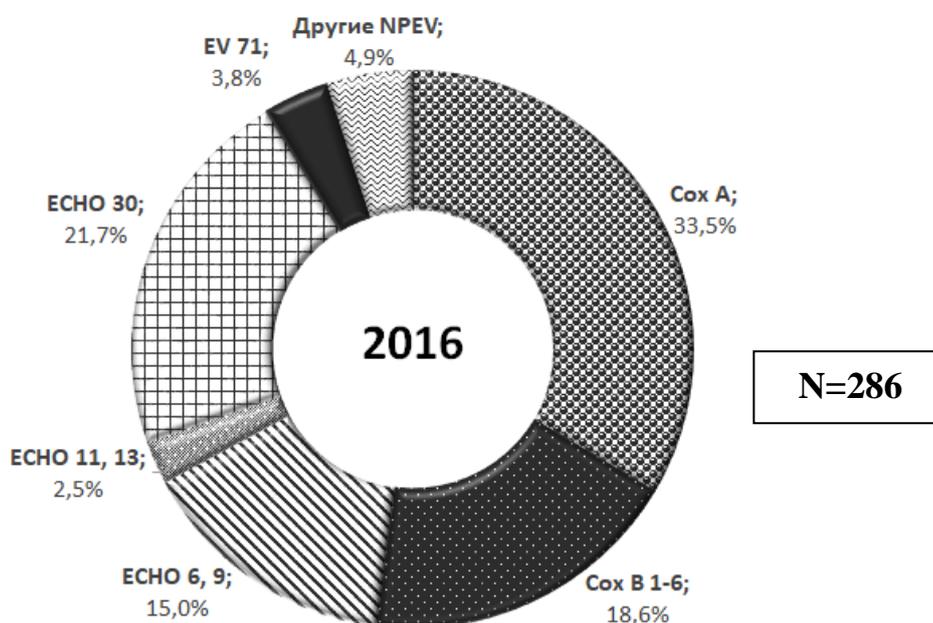


Рис. 4.6. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 13 территориях СПб РЦ в 2016 г.

В следующем, **2017** году было выделено больше различных серотипов CVA (57,2% от общего числа), чем в другие годы наблюдения ($p < 0,05$) (рис. 4.7). Среди серотипов были представлены CV A1, A2, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A16. Чаще других встречались серотипы CVA6 (64,3% от общего количества CVA, выделены на всех территориях за исключением Новгородской области и Республики Карелия) и CVA4 (15,5% от общего количества CVA, выделены на 6 территориях). Доля CVB, начавшая уменьшаться в 2016 г., в 2017 г. достигла минимума за шестилетний период наблюдения: 11,0%. В этом же году было выделено достаточно много ЭВ ЕСНО 18 – 5,3%. Энтеровирусы данного серотипа ранее редко выделялись на территориях СПб РЦ, однако в 2017 г. они вызвали вспышку ЭВИ в Саратовской области. Столько же (5,3%) от общего количества составила доля EV71. Из других вирусов ЕСНО были представлены серотипы 6, 9 (3,9%), 11, 13 (4,2%) и 3, 4, 5, 20, 25, вместе составившие 2,8%.

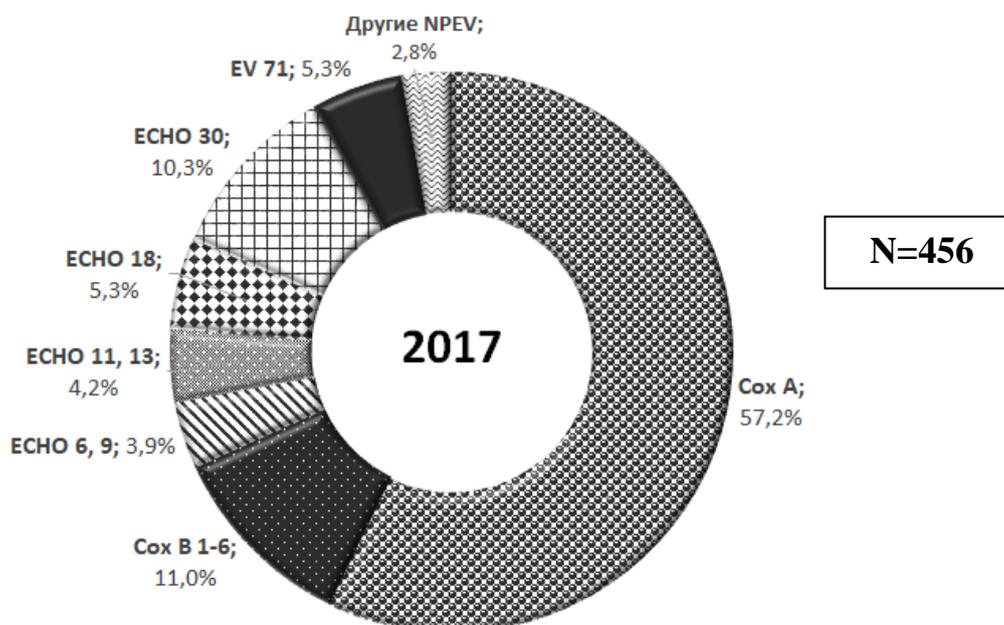


Рис. 4.7. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 14 территориях СПб РЦ в 2017 г.

В целом за 6 лет (с 2012 по 2017 гг.) из проб, взятых у больных ЭВИ, чаще всего выделялись ЭВ СВА (33% от общего количества выделенных энтеровирусов), СВВ (27%) и ЕСНО 30 (19%) (рис. 4.8). Энтеровирусы ЕСНО 6, 7, 9 (7%) и 11, 13 (5%) выделялись в почти одинаковом количестве. Доля EV 71 составила 4%. Другие серотипы вирусов ЕСНО, в том числе ЕСНО18, а также EV68, 70, 75, 76 составили 5%. Следует отметить, что за шесть лет неидентифицированным остался 101 энтеровирус (5,4% от общего количества энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ курируемых территорий, не входит в рисунок).

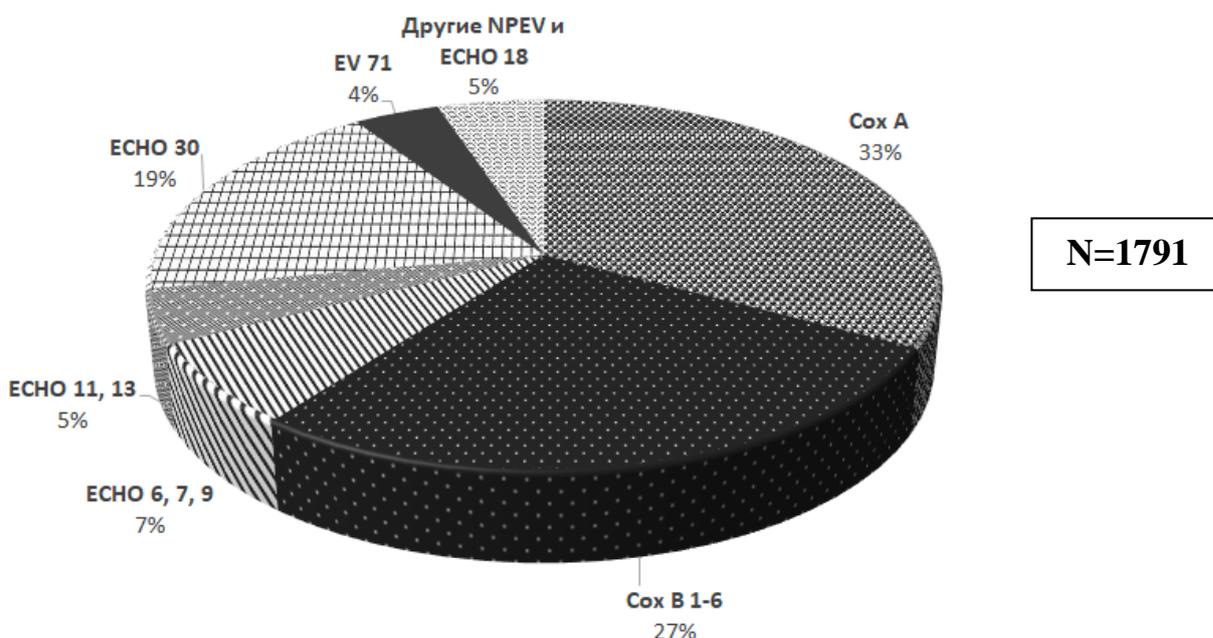


Рис. 4.8. Спектр энтеровирусов, выделенных от больных ЭВИ на 14 территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

На рис. 4.9, где представлен процент выделения в разные годы трёх основных серотипов энтеровирусов, вызывающих энтеровирусную инфекцию на территориях СПб РЦ, можно проследить, как эти серотипы сменяют друг друга. Так, в циркуляции ЭВ ЕСНО 30 отмечено два пика: в 2013 и 2016 годах, когда ЭВ этого серотипа вызывали подъёмы заболеваемости энтеровирусным менингитом на многих территориях России, в том числе курируемых СПб РЦ. ЭВ СVA, которые до 2016 г. включительно не представляли большой угрозы, в 2017 г. вышли на первое место по выделению от больных ЭВИ, доминируя в циркуляции на 6 территориях СПб РЦ. Увеличение процента выделения ЭВ CVB было отмечено в годы, когда заболеваемость ЭВИ в регионе находилась на низком уровне и была обусловлена преимущественно спорадическими случаями инфекции.

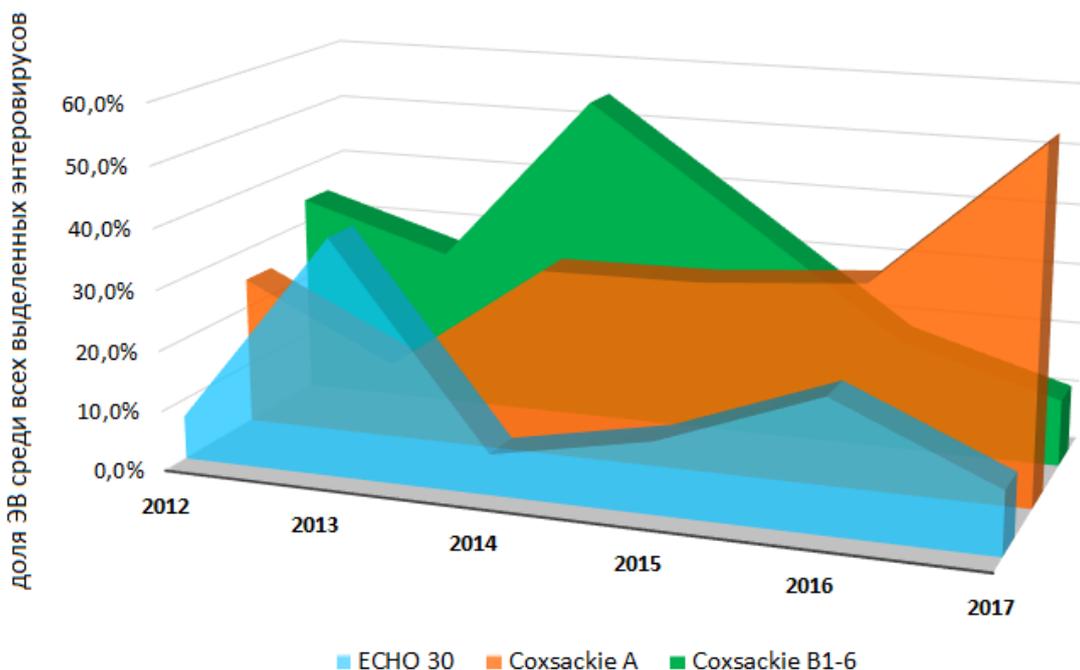


Рис. 4.9. Смена основных серотипов энтеровирусов, вызывающих энтеровирусную инфекцию на территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

Таким образом, если в начальный период наблюдения в циркуляции на территориях СПб РЦ преобладали ЭВ CVB и ЭВ ECHO разных серотипов, то к 2017 году ЭВ CVA заняли лидирующую позицию в циркуляции среди больных ЭВИ.

4.2. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией на территориях, курируемых СПб РЦ

Анализ заболеваемости ЭВИ проводился на основе сведений, полученных из формы государственного статистического наблюдения №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и документации для подтверждения свободного от полиомиелита статуса курируемых территорий.

Заболеваемость ЭВИ в Российской Федерации и на отдельных её территориях представлена на рис. 4.10. За рассматриваемый период в стране существенные подъёмы заболеваемости энтеровирусной инфекцией были отмечены в 2013 и 2017 годах. Это обычно связано со сменой ведущего серотипа ЭВ в результате заноса в популяцию нового серотипа ЭВ либо нового патогенного генотипа энтеровируса, ранее на данной территории не

распространённого.

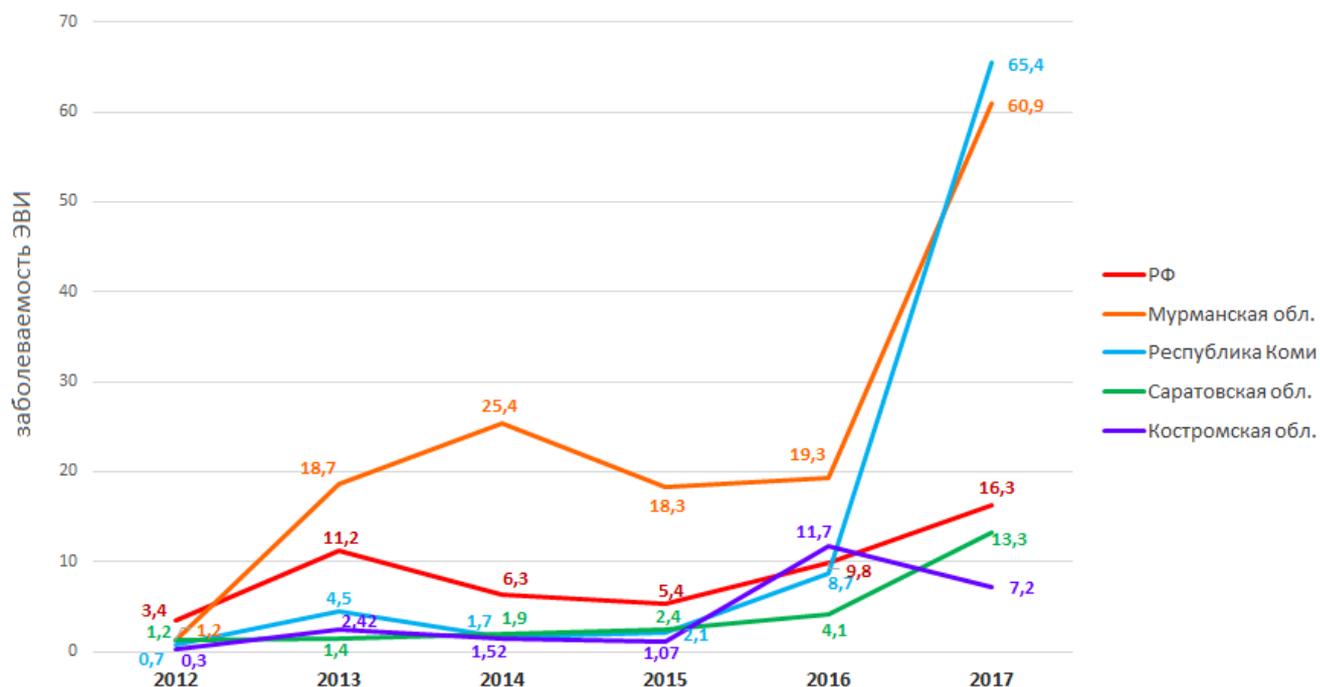


Рис. 4.10. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией в России и отдельных территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

В 2012 г. более высокие показатели заболеваемости ЭВИ, по сравнению с РФ, отмечались в Ленинградской, Новгородской и Калининградской областях. В целом в этом году показатели заболеваемости ЭВИ были низкими, как и в 2014 г.

В 2013 г. заболеваемость энтеровирусной инфекцией резко возросла как в целом по РФ (11,2 на 100 000 населения против 3,4 на 100 000 населения в 2012 г.), так и на территориях СПб РЦ. Чаще всего регистрировались энтеровирусные менингиты, в основном болели дети 3-17 лет. Выше всего показатель заболеваемости был в Вологодской (37,6 на 100 тыс. населения), Новгородской (29,5 на 100 тыс.), Мурманской (18,7 на 100 тыс.) и Архангельской (8,9 на 100 тыс.) областях (рисунки 4.10, 4.11); на этих территориях регистрировались групповые заболевания энтеровирусным менингитом. Групповая заболеваемость в организованных коллективах была связана с заносом инфекции в учреждения и дальнейшим её распространением контактно-бытовым путём. В Санкт-Петербурге пострадали 9 детей из оздоровительного лагеря «Океан»,

проживавшие в одном корпусе и посещавшие бассейн в одно и то же время, следовательно, фактором передачи вероятнее всего явилась вода бассейна [5]. В 2015 г. групповое заболевание ЭВМ, вызванное ЕСНО 30, было зарегистрировано в одной из школ Санкт-Петербурга.

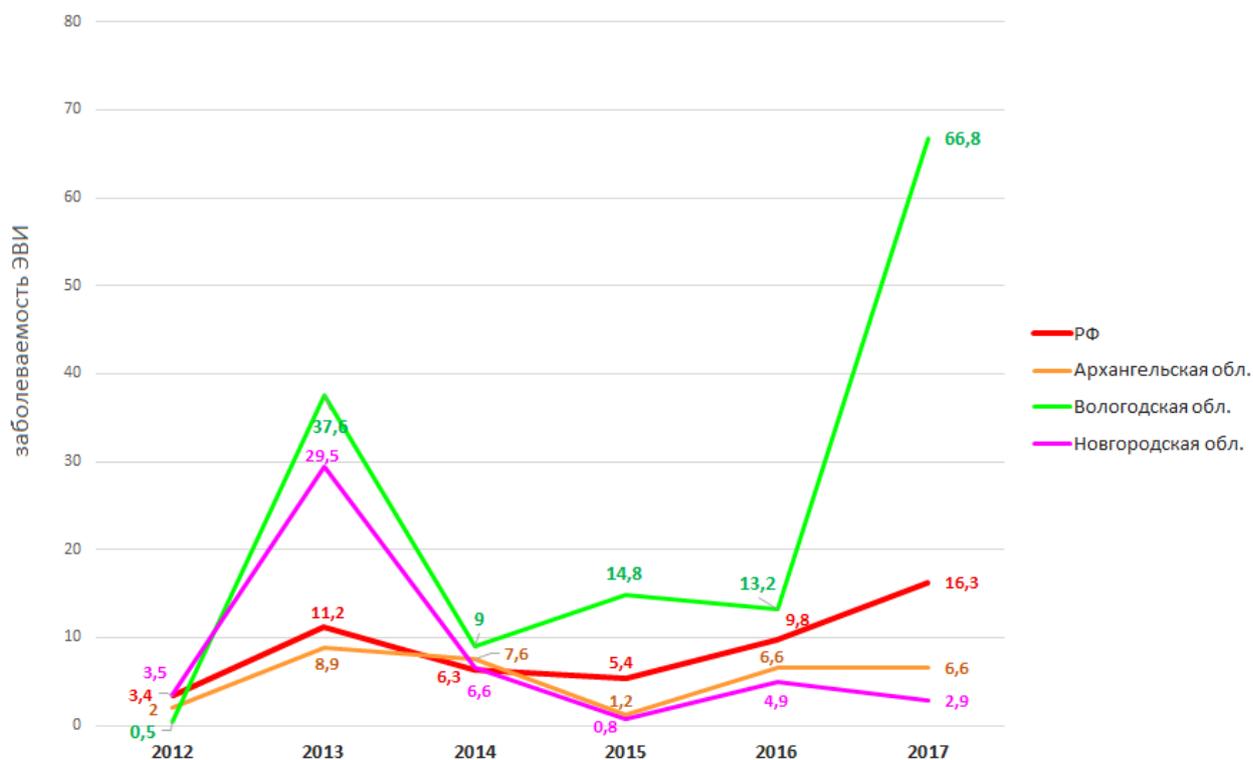


Рис. 4.11. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией в России и отдельных территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

С 2009 г. помимо традиционных для территорий СПб РЦ энтеровирусов серотипов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, нередко вызывающих энтеровирусный менингит, ещё одним этиологическим агентом заболеваний ЭВИ становятся вирусы СVA, которые вызывают другую форму ЭВИ: экзантему полости рта и конечностей. В русскоязычной литературе это заболевание принято называть либо энтеровирусная экзантема, либо экзантема полости рта и конечностей, что близко к общепринятому англоязычному термину hand, foot and mouth disease (HFMD).

В конце 2009-2010 гг. вирус СVA16 явился этиологическим фактором энтеровирусной экзантемы у детей из ДДУ и нескольких школ Мурманской области. В оздоровительном лагере Новгородской области в 2010 году был зарегистрирован очаг из 7 случаев энтеровирусной экзантемы полости рта и

конечностей. Заболевания протекали в легкой форме в виде везикулезных высыпаний на поверхностях кистей, стоп и слизистой рта. В 2012 г. в Ленинградской области CVA16 вызвал групповые заболевания экзантемой полости рта и конечностей в двух дошкольных учреждениях среди детей до четырех лет [6]. Во всех случаях передача инфекции осуществлялась контактно-бытовым путем.

В 2016 г. после спада заболеваемости в предыдущие два года кривая заболеваемости снова резко пошла вверх [27], количество заболевших по стране превысило средний многолетний уровень, показатель составил 9,79 на 100 тыс. Сезонный подъем заболеваемости был отмечен на ряде территорий СПб РЦ: в Мурманской (19,3 на 100 тыс.), Калининградской (12,69 на 100 тыс.) и Костромской (11,77 на 100 тыс. населения), а также Саратовской (4,1 на 100 тыс.) областях.

В Саратовской области отмечался более интенсивный, чем в предыдущие три года, сезонный подъем заболеваемости ЭВИ, отчасти связанный с энтеровирусом ЕСНО 30. Несмотря на относительно низкий по сравнению с другими упомянутыми областями показатель заболеваемости ЭВИ (4,1 на 100 тыс.), этот показатель на 88% превысил среднемноголетний показатель по данной территории. Диагноз «энтеровирусная инфекция» был подтвержден методом ПЦР в 103 случаях, из которых 80 пациентам был поставлен диагноз «энтеровирусный менингит». Этиологический агент был установлен в 45 случаях заболевания. Из них в 28 случаях это оказался ЕСНО30, в 5 случаях - CVA и в 4 - CVB. Кроме того, два штамма ЕСНО 30 были выделены из проб сточной воды, забранных в этой же области.

В Костромской области показатель заболеваемости ЭВИ был в 11 раз выше, чем в предыдущем году. Согласно результатам эпидемиологического расследования, распространению энтеровирусов среди детей способствовало, по всей вероятности, купание в реке Волге, поскольку в речной воде методом ПЦР была обнаружена РНК энтеровирусов. Вирус также распространялся традиционным контактно-бытовым путём. Нами было исследовано 55 фекальных

проб от больных ЭВИ из Костромской области с различными диагнозами (ЭВМ, гастроэнтерит, острая респираторная вирусная инфекция с нейротоксикозом, энтеровирусная лихорадка и др.) и 26 проб сточной воды. Энтеровирусы были выделены из 35 проб от больных ЭВИ (63,6% положительных проб). В 26 случаях это был вирус ЕСНО 30 (74,3% от общего числа выделенных ЭВ), в одном случае – СVA, 8 НПЭВ идентифицировать вирусологическим методом не удалось.

В этом же году в Мурманской области основными нозологическими формами являлись герпангина и вирусная экзантема, серозным менингитом переболели лишь 7% от всех больных ЭВИ. Из проб от больных выделялись различные штаммы вирусов СVA, CVB4 и EV71 [41].

В Калининградской области от больных выделялись ЭВ СVA пяти серотипов, CVB трёх серотипов и вирусы ЕСНО преимущественно серотипов 6 и 9.

Незначительный по сравнению с общероссийским подъём заболеваемости был отмечен в Ленинградской области (6,73 на 100000 населения, в 1,8 раз выше среднемноголетнего показателя по этой территории). Были зарегистрированы групповые случаи заболеваний ЭВИ в двух дошкольных образовательных учреждениях, вовлечён 21 ребенок. Большая часть случаев ЭВИ (50,4%) была представлена экзантемой полости рта и конечностей и герпангиной, на долю энтеровирусного менингита пришлось 11,3% случаев. Из проб от больных выделялся вирус СVA6.

В 2017 году заболевания энтеровирусной инфекцией на многих территориях СПб РЦ протекали в виде герпетической ангины и экзантемных форм, в том числе в виде вирусной экзантемы полости рта и конечностей. Высокий процент этих форм ЭВИ наблюдался в Мурманской области (78,8%) и в Республике Коми (59,5%). Заболеваемость энтеровирусным менингитом практически на всех территориях была существенно ниже, чем в предыдущие годы. В форме энтеровирусного менингита протекали лишь 16% случаев заболевания. ЭВМ преобладал среди клинических форм только в Саратовской области, составив 65,2% от всех зарегистрированных форм ЭВИ [45].

В Саратовской области в 2017 году были зарегистрированы максимальные показатели заболеваемости ЭВИ с момента начала регистрации инфекции. Суммарный показатель заболеваемости ЭВИ составил 13,27 на 100 тыс. населения и превысил среднегодовой показатель в 5,7 раза. Заболеваемость ЭВМ также превысила среднегодовой показатель в 4,5 раза, составив 8,6 на 100 тыс. населения. Этиологическими агентами ЭВМ явились ЭВ ЕСНО 18 (в 41,2% случаев) и ЕСНО 30 (12,3%), кроме того во многих случаях были выделены СВА: А4, А6 и А10 (31,4%). Впервые за многолетний период наблюдения подъём заболеваемости ЭВИ был вызван ЭВ ЕСНО 18, ранее этот энтеровирус на территориях СПб РЦ от больных не выделялся. По одному вирусу ЕСНО 18 было выделено от больных ЭВИ в Ненецком автономном округе и Ленинградской области. В спортивном лагере в Ленинградской области от пяти заболевших энтеровирусным менингитом (все пятеро - подростки из Санкт-Петербурга) кроме одного ЭВ ЕСНО 18 были выделены три ЭВ ЕСНО 9 [45].

В Мурманской области в 2017 г. показатель заболеваемости ЭВИ составил 60,96 на 100 тыс. населения (см. рис. 4.10). В структуре ЭВИ преобладали экзантемные формы заболевания (78,8%), удельный вес энтеровирусного менингита составил всего 0,5 % (2 случая против 338 случаев экзантемных форм). Было зарегистрировано два групповых очага ЭВИ с 11 случаями заболевания в детских дошкольных учреждениях с контактно-бытовым путем передачи инфекции. От больных ЭВИ и контактных лиц чаще всего выделялись СВА (А2, А4, А6, А10, А16 – суммарно 46,7% от всех обнаруженных энтеровирусов), EV71 (26,7%), CVB (20%) [45].

В Республике Коми в 2017 году показатель заболеваемости составил 65,4 на 100 тыс. населения (см. рис. 4.10). Суммарная доля вирусной экзантемы и герпетической ангины в структуре заболеваемости ЭВИ была равна 60% (332 случая). Было зарегистрировано три очага групповой заболеваемости в форме вирусной экзантемы с общим числом заболевших 19 человек, два из них были в детских учреждениях, где имел место контактно-бытовой путь передачи. От больных в основном выделялись ЭВ СВА (А6, А10), EV71 и ЕСНО 30 [45].

4.3. Периодические подъёмы и групповые заболевания энтеровирусной инфекцией с различными клиническими формами на территориях СПб РЦ

Данные о заболеваемости энтеровирусной инфекцией на территориях СПб РЦ были взяты из документации для подтверждения свободного от полиомиелита статуса территорий. Для анализа были отобраны только лабораторно подтверждённые случаи энтеровирусного менингита (1669 случаев) и экзантемных форм ЭВИ (2424 случая). Заболеваемость и соотношение удельного веса основных клинических форм ЭВИ на территориях СПб РЦ год от года менялось (рис. 4.12, табл. 8). На ряде территорий (г. Санкт-Петербург ($p < 0,05$), Саратовская ($p < 0,05$), Новгородская ($p < 0,05$), Архангельская области) превалировал энтеровирусный менингит, на других (Вологодская, Мурманская ($p < 0,05$), Ленинградская ($p < 0,05$) области, Республика Коми) чаще встречались экзантемные формы энтеровирусной инфекции: герпангина, ящуроподобный синдром, экзантема.

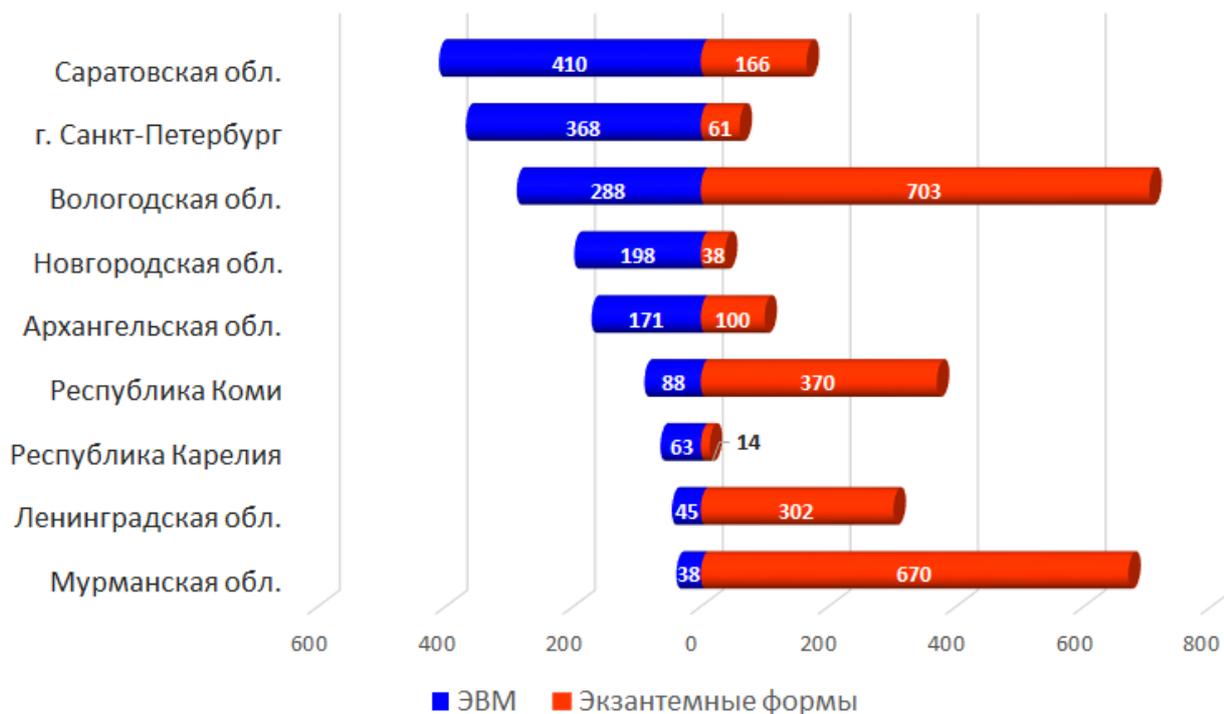


Рис. 4.12. Количество зарегистрированных случаев энтеровирусного менингита и экзантемных форм инфекции на 9 территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

Таблица 8

Доля энтеровирусного менингита и экзантемных заболеваний в общей заболеваемости энтеровирусной инфекции на ряде территорий РФ в 2012-2017 гг.

Территория	2012		2013		2014	
	ЭВМ %	экзант. %	ЭВМ %	экзант. %	ЭВМ %	экзант. %
г. Санкт-Петербург	95,5±3,5	0	93,7±2,2	0	81,2±5,6	8,3±4,0
Саратовская обл.	100,0	0	73,5±7,6	26,5±7,6	70,2±6,7	25,5±6,4
Новгородская обл.	40,9±10,5	18,2±8,2	73,5±3,2	3,8±1,4	58,5±7,7	21,9±6,5
Архангельская обл.	58,3±10,1	12,5±6,8	78,8±4,0	14,4±3,4	14,8±3,8	30,7±4,9
Республика Карелия	0	33,3±27,2	45,0±6,4	6,7±3,2	78,6±11,0	14,3±9,4
Республика Коми	66,6±19,3	0	70,0±7,2	12,5±5,2	13,3±8,8	53,3±12,9
Вологодская обл.	33,3±19,2	16,6±15,2	49,7±2,4	20,1±1,9	22,2±3,3	33,3±3,8
Ленинградская обл.	2,9±1,6	52,9±4,9	16,5±4,2	15,2±4,0	2,8±2,0	15,7±4,3
Мурманская обл.	33,3±15,7	66,6±15,7	14,6±3,0	23,4±3,6	0,5±0,5	60,3±3,5
Территория	2015		2016		2017	
	ЭВМ %	экзант. %	ЭВМ %	экзант. %	ЭВМ %	экзант. %
г. Санкт-Петербург	87,5±6,8	4,2±4,1	89,6±3,5	2,6±1,8	35,6±3,1	22,6±2,7
Саратовская обл.	42,6±6,3	54,1±6,4	77,7±4,1	16,5±3,7	65,2±2,6	28,8±2,5
Новгородская обл.	40,0±21,9	20,0±17,9	65,4±8,7	42,3±9,0	55,5±11,7	33,3±11,1
Архангельская обл.	28,6±12,1	50,0±13,4	43,6±5,6	12,8±3,8	31,2±5,3	49,3±5,7
Республика Карелия	28,6±17,1	28,6±17,1	50,0±7,5	6,8±3,8	33,4±27,2	66,6±27,2
Республика Коми	33,3±11,1	27,7±10,5	26,6±5,1	26,6±5,1	5,4±1,0	59,5±2,1
Вологодская обл.	5,1±1,6	61,9±3,4	17,2±3,0	82,8±3,0	10,1±1,1	47,0±1,8
Ленинградская обл.	7,0±3,9	11,6±4,9	11,3±3,0	50,4±4,7	4,2±1,2	62,1±3,0
Мурманская обл.	1,4±1,0	71,6±3,8	7,1±2,1	53,9±4,2	0,5±0,3	78,8±2,0

В разные годы число случаев энтеровирусного менингита колебалось от 75 в 2015г. до 598 случаев в 2013 г., когда на ряде территорий СПб РЦ было зафиксировано повышение заболеваемости энтеровирусным менингитом, связанное с завозом энтеровируса ЕСНО 30 генотипа h из Китая. Наибольшее количество пациентов с этой формой инфекции наблюдалось в Санкт-Петербурге (93,7% ЭВМ от общего количества случаев ЭВИ), Новгородской (73,5%) и

Вологодской (49,7%) областях.

В 2016 г. на ряде территорий СПб РЦ также происходил периодический подъём заболеваемости энтеровирусным менингитом, связанный с энтеровирусом ЕСНО 30.

В 2017 г. заболеваемость ЭВМ практически на всех территориях СПб РЦ была существенно ниже, чем в предыдущие годы. Только в Саратовской области были зарегистрированы максимальные показатели заболеваемости энтеровирусной инфекцией с момента начала её регистрации, в том числе показатель заболеваемости ЭВМ превысил среднемноголетний показатель в 4,5 раза: доля данной клинической формы инфекции составила 65,2% от общего количества зарегистрированных случаев ЭВИ.

Количество случаев экзантемных форм энтеровирусной инфекции в разные годы периода наблюдения составляло от 70 случаев в 2012 г. до 1391 случая в 2017 г. Заболеваемость экзантемными формами ЭВИ начала расти после 2014 г., когда на 10 территориях было зарегистрировано более двухсот случаев с диагнозами «герпангина», «экзантема» и «ящуроподобный синдром». Первые два диагноза ставились чаще, чем последний.

В 2017 году число экзантемных форм ЭВИ резко увеличилось. Чаще других экзантемные формы ЭВИ в 2017 г. регистрировались в Мурманской (78,8% экзантемных форм заболевания от общего количества случаев ЭВИ) и Ленинградской (62,1%) областях, Республиках Карелия (66,6%) и Коми (59,5%). Между формами заболеваний ЭВИ и выделением энтеровирусов от больных прослеживается связь: в 2017 г. от больных энтеровирусной инфекцией, в том числе в перечисленных регионах, чаще других выделяли энтеровирусы серотипов СVA (см. рис. 4.7), которые и обуславливают экзантемные формы инфекции.

4.4. Молекулярно-генетический анализ энтеровирусов, выделенных во время периодических подъёмов и групповых заболеваний энтеровирусной инфекцией на территориях СПб РЦ

4.4.1. Энтеровирусы серотипов ЕСНО, вызвавшие подъёмы заболеваемости энтеровирусным менингитом

Энтеровирусный менингит, возбудителями которого могут быть различные серотипы энтеровирусов, является наиболее частым из тяжелых и требующих госпитализации проявлений ЭВИ. Случаи ЭВМ ежегодно регистрируются на многих территориях РФ. Основными этиологическими агентами ЭВМ на территориях, курируемых СПб РЦ, являются вирусы серотипов ЕСНО 6 и 30. Подъёмы заболеваемости, вызванные ЭВ ЕСНО 6, происходили на территориях СПб РЦ в 2008-2009 гг., вне рамок рассматриваемого периода. В 2012-2017 гг. ЭВ ЕСНО 6 вызывал преимущественно спорадические случаи ЭВМ. ЭВ ЕСНО 30 широко циркулирует как на территориях СПб РЦ, так и на территории РФ в целом, обуславливая периодические подъёмы заболеваемости энтеровирусным менингитом.

В 2013 г. на многих территориях РФ, в том числе на половине территорий СПб РЦ, был отмечен подъём заболеваемости, связанный с ЕСНО 30. В структуре заболеваемости ЭВИ энтеровирусные менингиты составляли 63,8%. На ряде территорий их доля была выше и составила в Архангельской области - 78,8%, в Новгородской - 73,5%, в Вологодской – 49,7%. Циркуляция ЭВ ЕСНО30 была отмечена на семи территориях Северо-Запада России (Республики Карелия и Коми, Архангельская, Вологодская, Калининградская, Новгородская области и г. Санкт-Петербург). Доля ЭВ ЕСНО30 составила 70,3% среди всех выделенных от больных вирусов серотипов ЕСНО [5].

Чтобы установить генетические взаимосвязи штаммов, выделенных в 2013 г. на территориях СПб РЦ, участки VP1 нуклеотидных последовательностей вирусов ЕСНО 30 секвенировали и сравнили с соответствующими участками, хранящимися в международной базе GenBank, а также с последовательностями, полученными при мониторинге за энтеровирусной инфекцией в Российской

Федерации в предыдущие пять лет. При филогенетическом анализе оказалось, что все штаммы принадлежали генотипу h, но разделились на две группы, что было подтверждено бутстрэп-анализом (рис. 4.13).

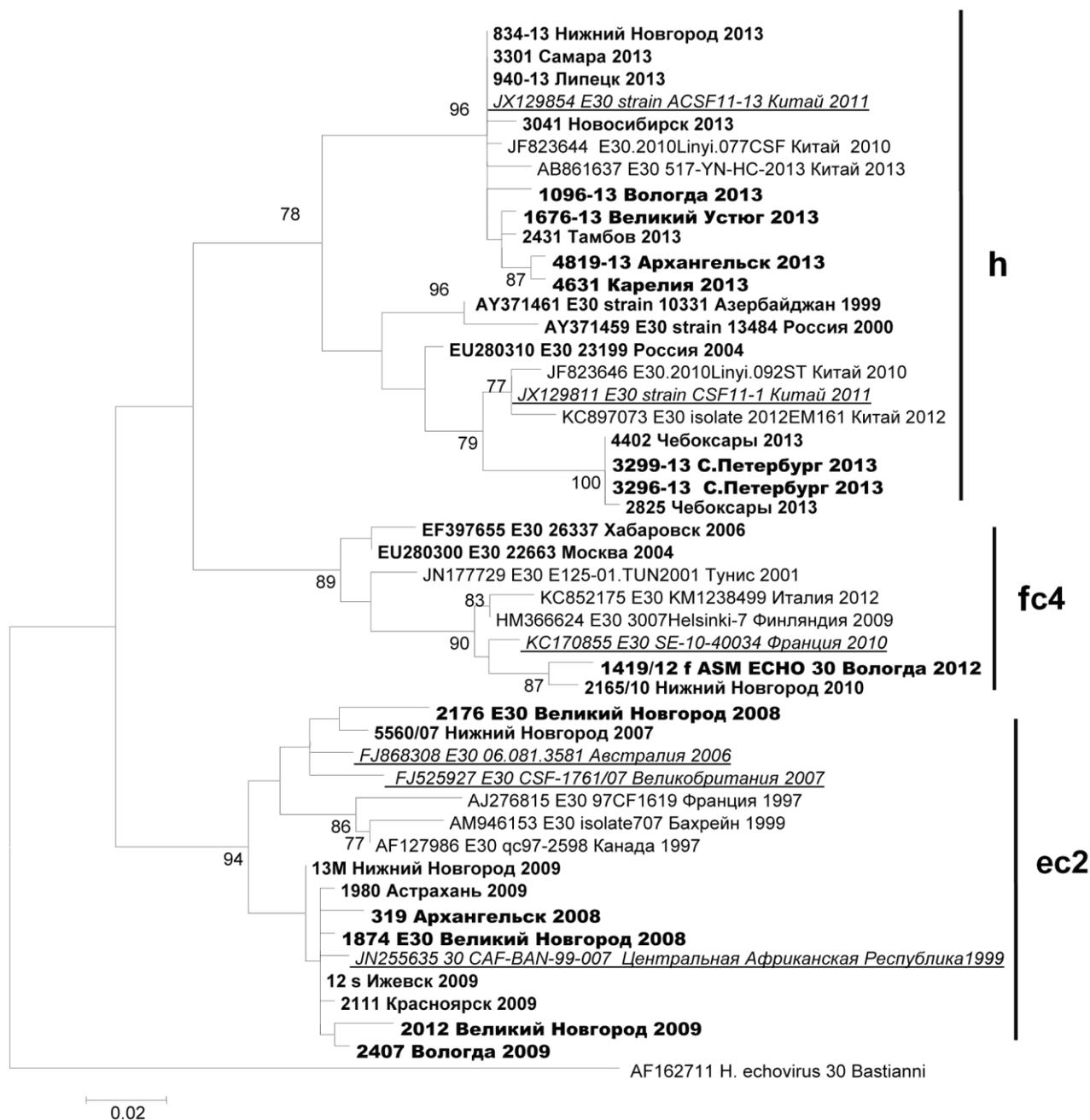


Рис. 4.13. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов ЕСНО 30, выделенных в 2013 г. в СПб РЦ и других регионах РФ.

К первой группе принадлежали штаммы ЕСНО 30 генотипа h, выделенные в 2013 г. от больных на четырёх территориях СПб РЦ (Нижегородская, Вологодская, Архангельская области и Республика Карелия), они были близки к

одному из геновариантов ЭВ ЕСНО 30 из провинции Fujian, выделенному в 2011 г. Штаммы ЭВ ЕСНО 30, выделенные от детей с энтеровирусными менингитами из оздоровительного лагеря «Океан» в Санкт-Петербурге, оказались родственны вирусам ЕСНО 30 другого геноварианта, выделенным от больных во время вспышек энтеровирусного менингита в китайской провинции Fujian в 2011 г. Также они оказались близки энтеровирусам ЕСНО 30, выделенным в 2013 году от больных ЭВМ в г. Чебоксары (99,7 % гомологии нуклеотидных последовательностей) [5]. Китайские штаммы из разных кластеров имели несколько аминокислотных замен. Родство российских штаммов со штаммами из разных кластеров свидетельствует о неоднократных независимых заносах штаммов ЕСНО30 генотипа h на территорию РФ.

Штаммы ЕСНО 30 2013 года не обладали близким родством со штаммами ЕСНО 30, выделенными на ряде территорий СПб РЦ (Архангельская, Вологодская, Новгородская, Нижегородская области) в предыдущие годы. Штаммы ЕСНО 30 2007-2009 годов относились к широко распространенному тогда в России генотипу es2, который прежде циркулировал в Европейском регионе и на других континентах. Вирус ЕСНО 30 генотипа fs4 был выделен от больного энтеровирусным менингитом из г. Вологды в 2012 г., но в дальнейшем широкого распространения не получил. Вирусы ЕСНО 30 генотипа fs4 были распространены в европейских странах, тогда как вирусы генотипа h в Европе в то время не выделялись. Вероятно, энтеровирус ЕСНО 30 генотипа h, широко циркулировавший в РФ, в том числе на наших территориях в 2013 году и ранее практически не выявлявшийся в стране, был занесен на территорию России из Юго-Восточной Азии [5].

После импортирования на территорию Российской Федерации, вирусы ЕСНО 30 генотипа h продолжили распространяться и изменяться независимо друг от друга. В последующие годы (2014-2016 гг.) они выделялись от больных энтеровирусным менингитом на разных территориях России и СПб РЦ (рис. 4.14). В 2016 г. в Костромской и Саратовской областях, относящихся к Центральному и Приволжскому федеральным округам, были зафиксированы подьёмы

заболеваемости ЭВИ, вызванные ЕСНО 30. Это произошло через три года после того как периодические подъёмы, вызванные вирусами этого же генотипа ЭВ ЕСНО 30, произошли на большинстве территорий СПб РЦ, находящихся на Северо-Западе России.

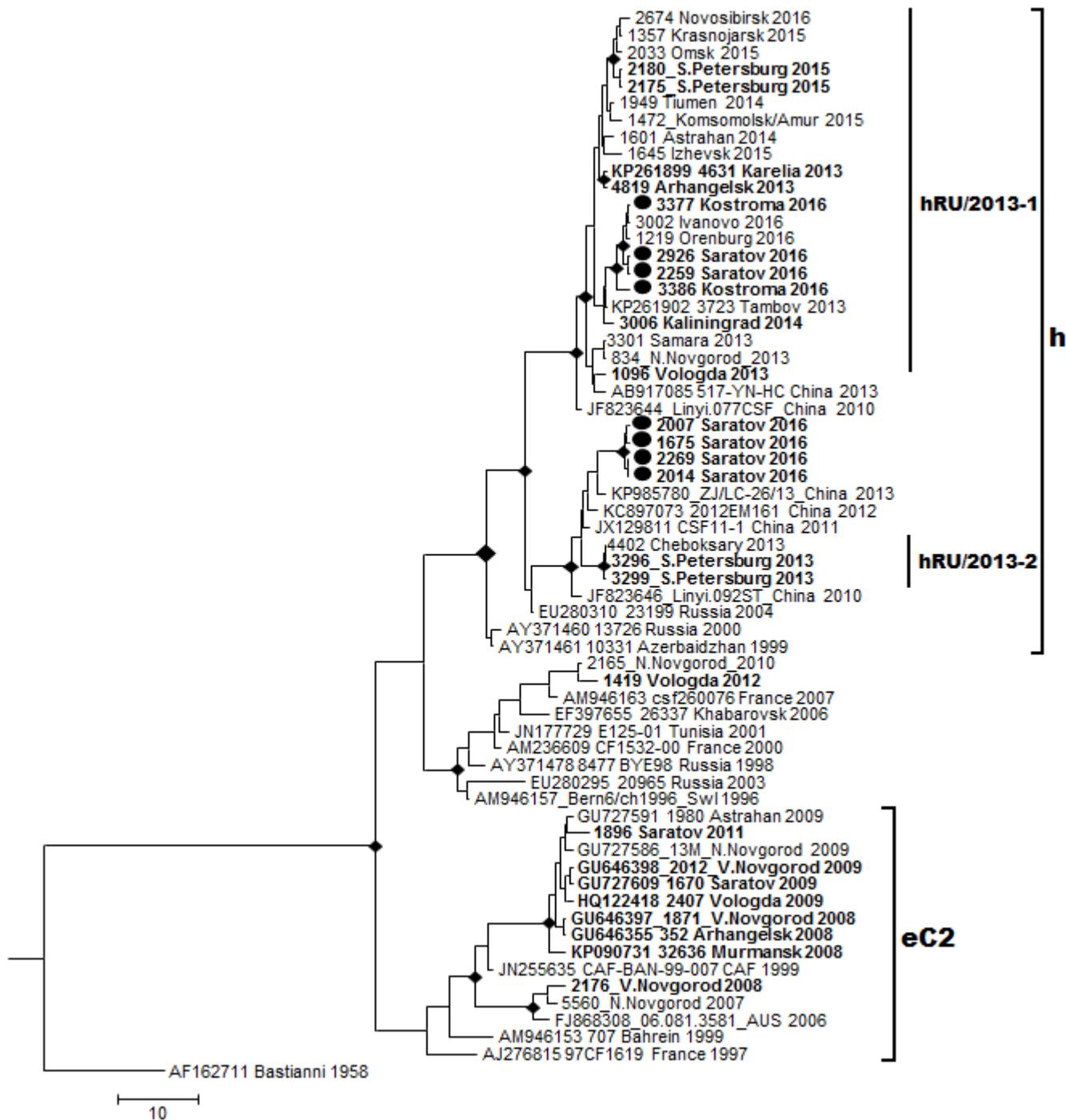


Рис. 4.14. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов ЕСНО30 (● – штаммы, выделенные в Костромской и Саратовской областях в 2016 г. ◆ - узлы с апостериорной вероятностью выше 0,95.)

Молекулярными методами были исследованы штаммы ЕСНО 30, выделенные от больных энтеровирусной инфекцией в этих областях, и проведено сравнение их с другими штаммами ЕСНО 30, выделенными в этом и предыдущих годах в разных регионах страны и мира (рис. 4.14). Штаммы принадлежали к генотипу h по классификации J. Baily [71], но поделились на две филогенетические группы.

Два штамма из Костромы и два из Саратова относились к тому же геноварианту h серотипа ЕСНО 30, что вызвал вспышки ЭВМ во многих областях РФ в 2013 г. Этот вариант в 2013-2016 годах широко циркулировал по всей России. Ещё четыре штамма из Саратова вошли в другой кластер. Гомология нуклеотидных последовательностей этих штаммов составляла более 97,3%, что говорит о возможной связи этих случаев заболевания. Однако данные штаммы отличались как от российских штаммов ЕСНО 30, так и от зарубежных. Самыми близкими (гомология 96,6-96,9%) к ним были штаммы ЕСНО 30, выделенные в 2011 и 2013 годах от больных энтеровирусным менингитом в китайских провинциях Fujian, Guangdong и Zhejiang.

В 2017 г. возбудителем групповых заболеваний энтеровирусным менингитом в Саратовской области, а также единичных случаях ЭВМ на других территориях СПб РЦ стал ЭВ ЕСНО 18. Вирус этого типа ранее выделялся от больных ЭВИ на территориях СПб РЦ очень редко [45]. Филогенетический анализ показал (рис. 4.15), что штаммы ЕСНО 18 из Саратова, НАО и Ленинградской области не имеют близкого общего предка, поскольку распределились по разным кластерам. Это свидетельствует о нескольких независимых заносах ЭВ ЕСНО 18 на разные территории СПб РЦ.

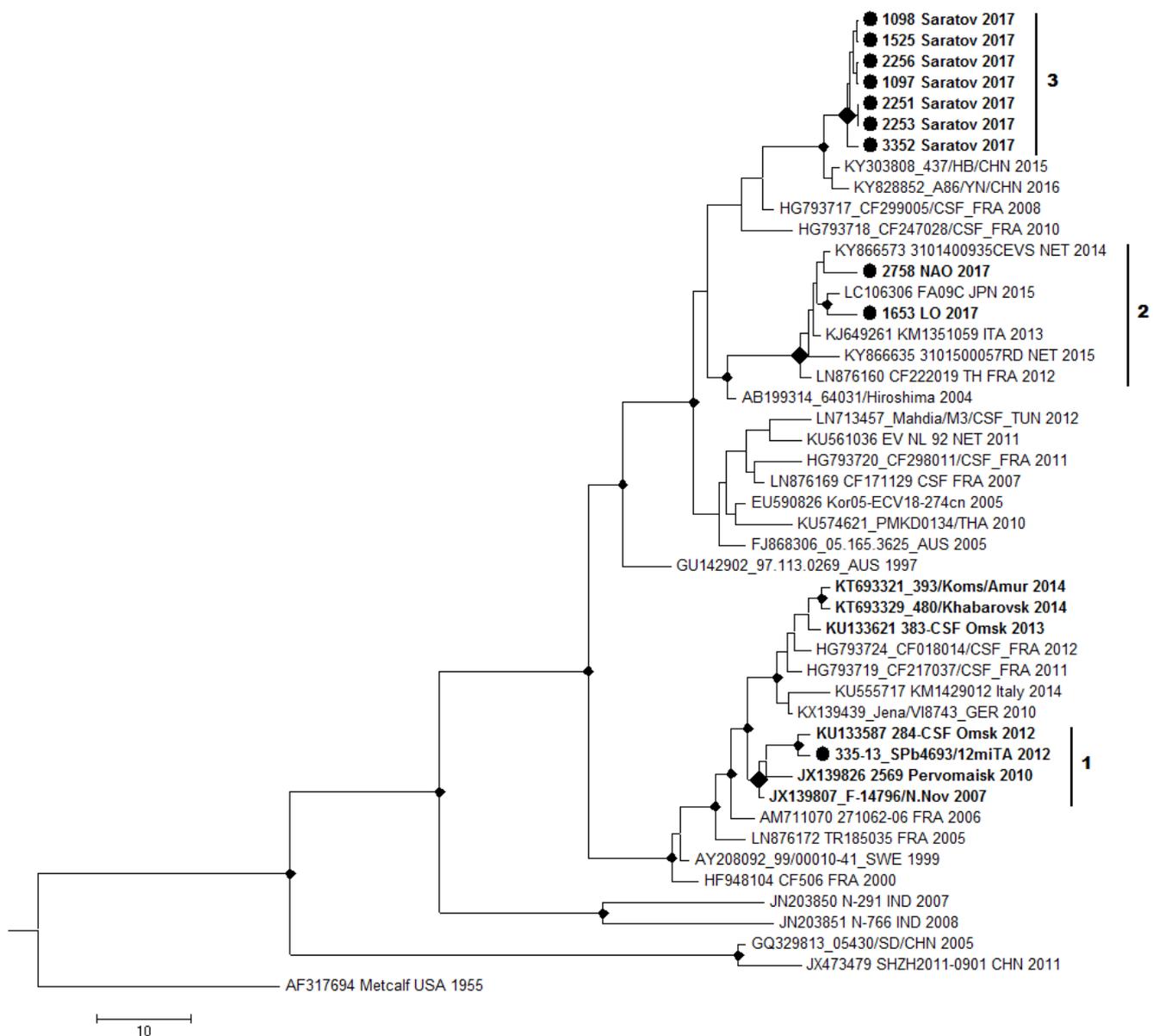


Рис. 4.15. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов ECHO 18 (Жирным шрифтом отмечены штаммы, выделенные на территории РФ, ● – штаммы, выделенные на территориях, курируемых СПб РЦ, ◆ - узлы с апостериорной вероятностью выше 0,95.)

Штаммы вируса ECHO 18, выделенные в Саратовской области из разных очагов ЭВМ, сгруппировались в один кластер с гомологией нуклеотидных последовательностей не менее 98,8%, что свидетельствует о близком родстве этих штаммов. Вероятно, после заноса одного штамма ECHO 18 в популяцию произошло последующее распространение вируса. Саратовские штаммы были относительно близки (96,9-97,5% гомологии) штамму, полученному в китайской провинции Неbei во время вспышки энтеровирусного менингита и энцефалита в

2015 г., а также штаммам, выделенным в 2016 г. в провинции Yunnan от двух детей с HFMD.

Штаммы ЕСНО 18, выделенные в Ленинградской области и НАО, не группировались между собой. Штамм от больного ЭВМ из Ленинградской области оказался близкородственен штамму, выделенному в 2015 г. в Японии от двухмесячной девочки с диагнозом «асептический менингит». Штамм ЕСНО 18 от больного острой кишечной инфекцией из НАО был относительно близок штамму ЕСНО 18, обнаруженному в сточной воде в Нидерландах в 2014 г.

Штамм ЕСНО 18, выделенный в 2012 г. от ребёнка без признаков ЭВИ, прибывшего в Саратовскую область из Республики Дагестан, на филогенетическом дереве отстоит далеко от штаммов, вызвавших подъём заболеваемости энтеровирусным менингитом в г. Саратов в 2017 г.. Данный штамм не имеет близкого родства со штаммами ЕСНО 18, выделенными на территориях СПб РЦ, однако достоверно группируется со штаммами ЕСНО 18, выделенными в других регионах России в 2007-2012 гг. Дети из Северо-Кавказского федерального округа прибывают в Саратовскую область для прохождения лечения в ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» МЗ РФ (НИИТОН СГМУ) и обследуются в лаборатории СПб РЦ сразу по поступлению. Таким образом штамм ЕСНО 18, выделенный от ребёнка из Республики Дагестан, был импортирован на территорию Саратовской области, а не получен в ходе лечения в НИИТОН СГМУ.

4.4.2. Энтеровирусы Coxsackievirus A, вызывающие энтеровирусную экзантему полости рта и конечностей

Экзантема полости рта и конечностей наиболее часто связана с энтеровирусами вида А: EV71, CVA6, A10 и A16. Экзантемные заболевания, вызванные вирусами CVA, чаще протекают довольно легко, без осложнений. Заболевания вирусной экзантемой полости рта и конечностей, вызванные энтеровирусом EV71 генотипа С4, циркулирующим преимущественно в Юго-

Восточной Азии, часто заканчиваются серьёзными неврологическими осложнениями, такими как энцефалит, энцефаломиелит, асептический менингит и полиомиелитоподобный паралич [159, 160, 177, 184].

Распространение вируса CVA6 в мире наблюдается с 2008 года, когда в Финляндии, а затем в других странах Европы, Азии и Северной Америки были зафиксированы обусловленные этим вирусом крупные вспышки экзантемных заболеваний [75, 148, 155]. Ранее вирус CVA6 вызывал в основном спорадические случаи экзантемных заболеваний преимущественно в регионе Юго-Восточной Азии, в Европейском регионе его присутствие отмечалось в редких случаях. Повсеместное распространение CVA6 связывают с формированием нового генотипа этого вируса [75].

Случаи заболевания экзантемой полости рта и конечностей, вызванные энтеровирусами вида А, были зарегистрированы как в России в целом, так и на курируемых территориях. Циркуляция ЭВ CVA16 впервые была зафиксирована на территориях СПб РЦ в конце 2009 года в Мурманской области. Затем вирусы этого серотипа помимо Мурманской были выделены в Новгородской и Ленинградской областях (рис. 4.16). В результате филогенетического анализа штаммы CVA16 из трёх областей распределились по двум группам, не слишком удалённым друг от друга [6].

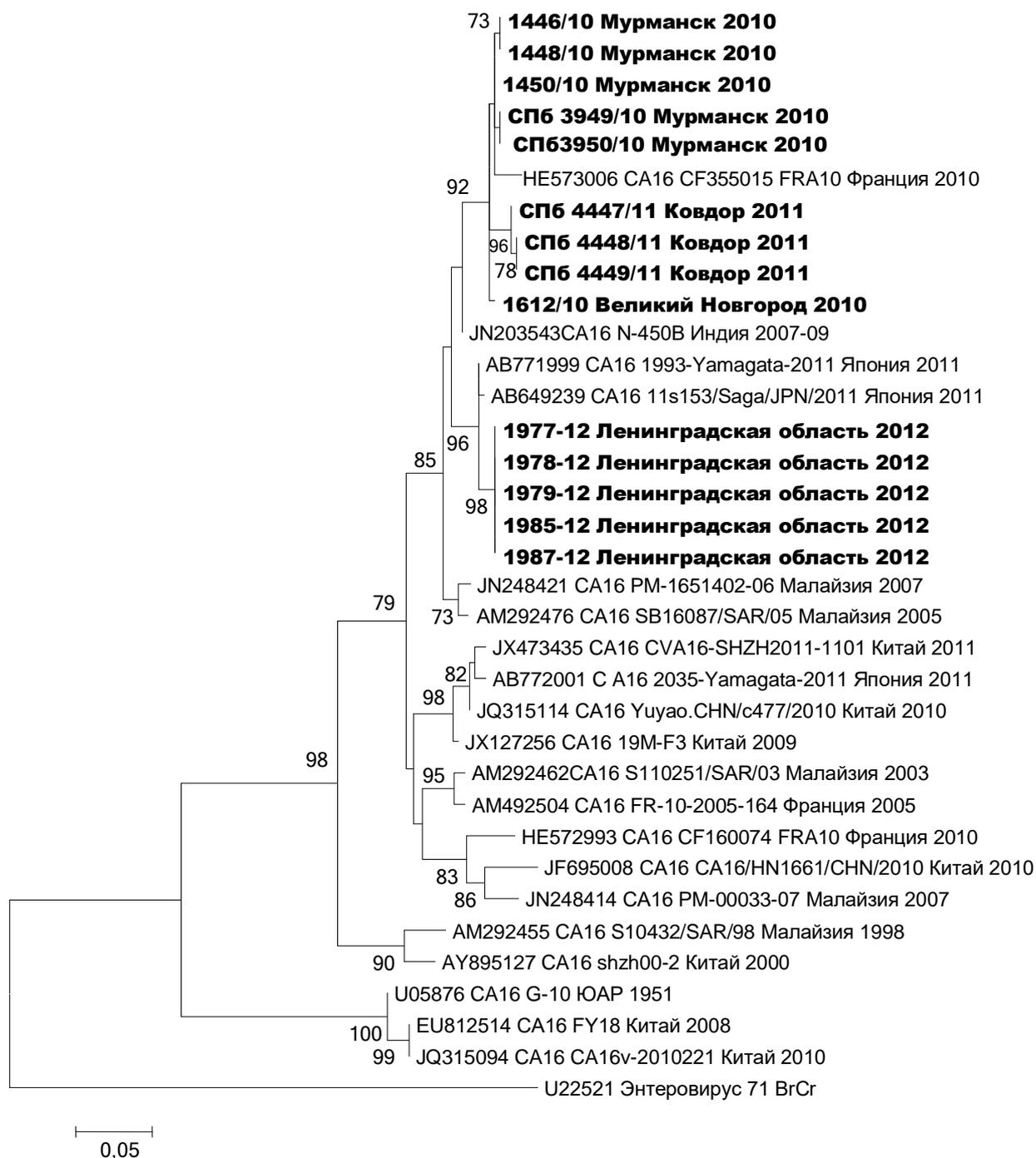


Рис. 4.16. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов CVA16, циркулировавших на Северо-Западе России в 2010-2012 гг.

В Мурманской области групповые заболевания вирусной экзантемой полости рта и конечностей регистрировались с 2009 по 2011 годы в городе Ковдор. Штаммы, выделенные от больных в этом городе, не были полностью идентичными. Последовательности штаммов, выделенных у больных из семейных

очагов в городе Мурманске, также отличаются друг от друга и от последовательностей штаммов из городов Ковдора и Великого Новгорода. Вероятно, штаммы вируса СVA16 из Мурманской области произошли из одного источника, но в процессе циркуляции среди здорового населения на данных территориях накопили нуклеотидные замены. Мурманская и Новгородская области находятся достаточно далеко друг от друга, импортирование СVA16 на эти территории могло произойти независимо, хотя нельзя исключать вероятность существования их относительно отдалённого общего предка, поскольку на филогенетическом древе все выделенные штаммы из материала от больных ЭВИ трёх областей находятся достаточно близко друг к другу.

Штаммы СVA16, выделенные у детей из двух ДДУ Ленинградской области, не отличались друг от друга на исследованном участке, что говорит об их близком родстве. Возможно, они происходили из одного источника. Эти штаммы были близкородственны штаммам СVA16, выделенным от больных HFMD в Японии в 2011 г. Штаммы СVA16 из Мурманской и Новгородской областей были близки штамму из Франции, выделенному во время крупной вспышки герпангины и HFMD в 2011 г. [148]. Впоследствии выделение вирусов СVA на территориях СПб РЦ перестало быть редкостью.

В 2017 г. доля различных вирусов СVA среди всех серотипов энтеровирусов, выделенных на территориях СПб РЦ, составила более 50% (см. рис. 4.7). Две трети от всех вирусов СVA пришлось на долю СVA6 (64,0%), который выделялся на всех территориях СПб РЦ.

Филогенетический анализ части штаммов показал, что ЭВ СVA6, выделенные на территориях СПб РЦ, относились к трём субгенотипам: 5, 6 и 8 (рис. 4.17).

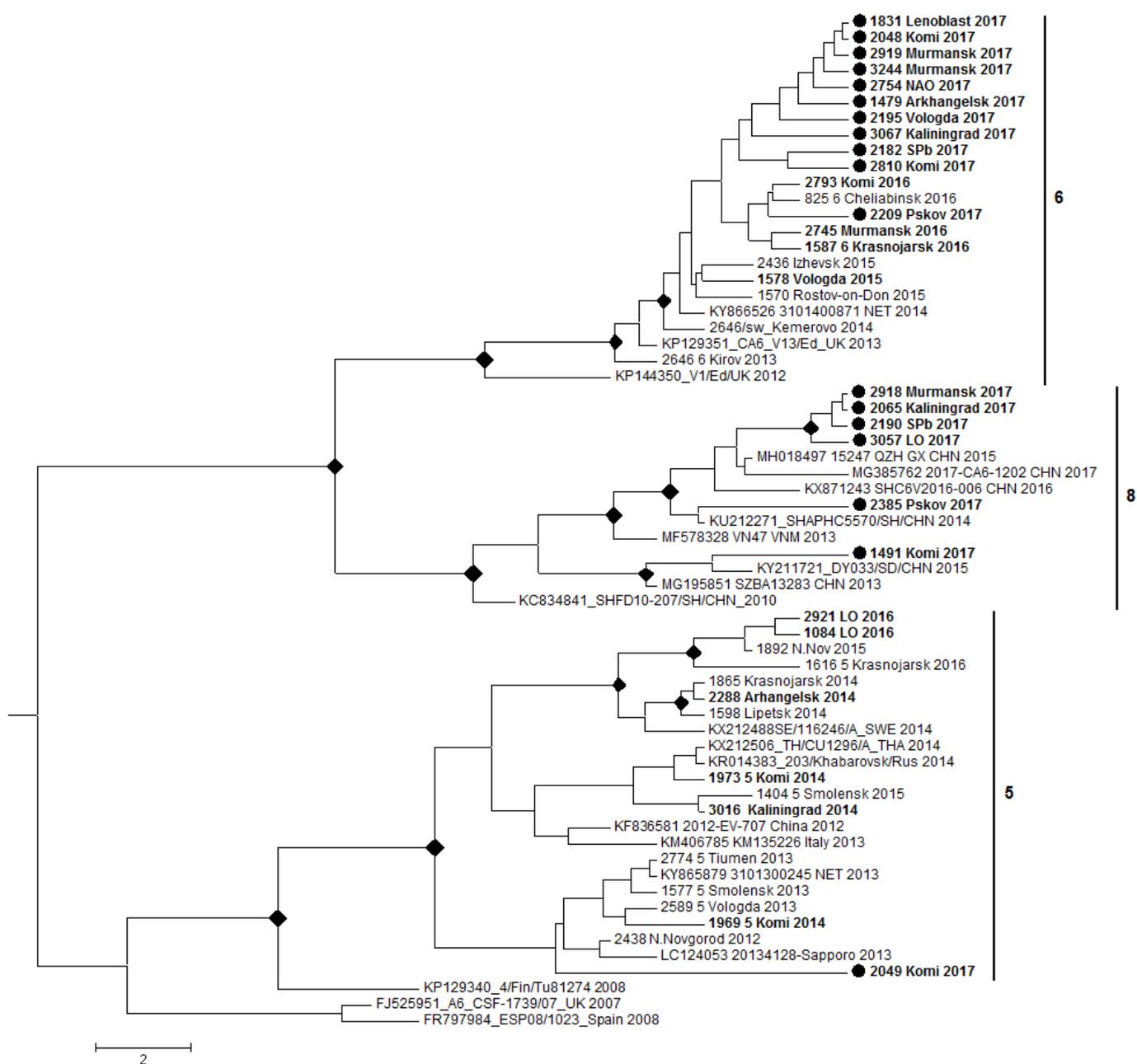


Рис. 4.17. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов пандемического варианта CVA6 (284 н.о). (Жирным шрифтом отмечены штаммы, выделенные на территориях СПб РЦ. ● – штаммы, идентифицированные в 2017 г. ◆ - узлы с апостериорной вероятностью выше 0,95.)

Субгенотип 5 в 2017 г. был представлен только одним штаммом из Республики Коми, но CVA6 этого же субгенотипа выделялись в СЗФО и в целом по России в предыдущие годы. Циркуляция субгенотипа 6 была отмечена в восьми субъектах СПб РЦ (Республика Коми, Архангельская, Вологодская, Калининградская, Ленинградская, Мурманская области, НАО, Санкт-Петербург),

субгенотипа 8 - в пяти субъектах (Республика Коми, Калининградская, Ленинградская, Мурманская областях, Санкт-Петербург). Вирусы, относящиеся к субгенотипу 8, оказались родственны вирусам CVА6 из Китая, а субгенотипам 5 и 6 – родственны как азиатским, так и европейским штаммам.

4.4.3. Энтеровирусы *Coxsackievirus B*, вызвавшие спорадические случаи энтеровирусного менингита

Энтеровирусы CVB серотипов 1-6 выделялись на каждой территории, курируемой СПб РЦ, в течение всего периода наблюдения. Из шести серотипов CVB чаще всего встречались 2, 3, 4 и 5, CVB1 и B6 на территориях СПб РЦ выделялись редко. В основном эти вирусы вызывают спорадические случаи энтеровирусного менингита и другие формы ЭВИ, а также острый вялый паралич. Анализ выделения трёх самых распространённых возбудителей энтеровирусного менингита (ЕСНО 6, ЕСНО 30 и CVB) от больных ЭВИ на территориях СПб РЦ показывает, что доля CVB среди них наибольшая: 53,1% против 36,2% у ЕСНО 30 и 10,7% у ЕСНО 6 (рис. 4.18). Энтеровирусы ЕСНО 30 в рассматриваемый период провоцировали ряд крупных вспышек и подъёмов заболеваемости на разных территориях РФ. Спорадическая заболеваемость ЭВИ из-за инфицирования вирусами CVB находилась на относительно постоянном уровне.

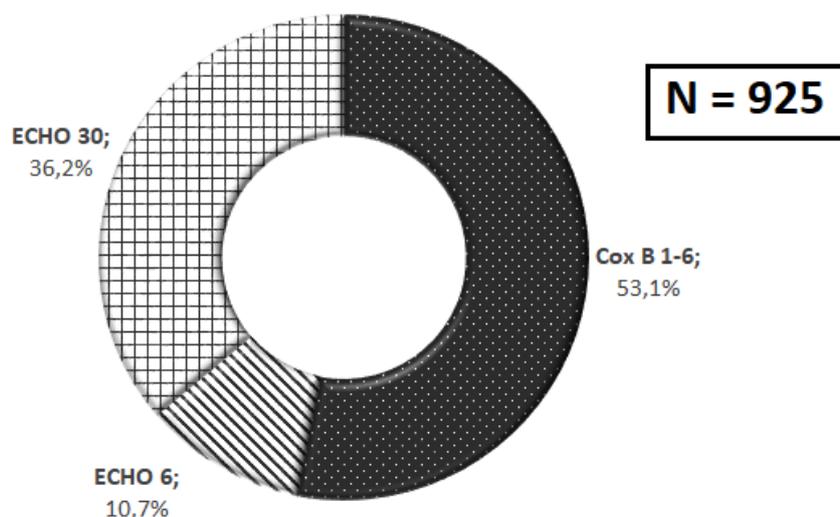


Рис. 4.18. Доля CVB среди трёх наиболее распространённых возбудителей энтеровирусного менингита, 2012-2017 гг.

Не во всех случаях заболевание с выделением ЭВ CVB протекало в форме энтеровирусного менингита. Эти вирусы были выделены от больных с диагнозами «ОРВИ» (острая респираторная вирусная инфекция) или «ОКИ» (острая кишечная инфекция) в отсутствие менингеальных симптомов, однако случаи были зарегистрированы как энтеровирусная инфекция, поскольку выделение энтеровирусов было подтверждено лабораторно.

В годы подъёмов заболеваемости, вызванных другими ЭВ, доля вирусов CVB в общей структуре заболеваемости снижалась, однако эти вирусы всегда выделялись от больных ЭВИ. За шестилетний период наблюдения от больных ЭВИ, преимущественно энтеровирусным менингитом, был выделен 491 штамм вирусов CVB различных серотипов, что составило 26,2%. Ежегодно выделяли от 50 до 163 штаммов этих энтеровирусов. Больше всего ЭВ CVB было выделено в 2014 г. (54,1% от общего количества выделенных ЭВ), меньше всего – в 2017 г., когда они составили всего 10,3% от общего числа выделенных энтеровирусов.

Вирусы CVB, как и другие энтеровирусы, не обязательно вызывают манифестную форму заболевания после попадания в организм. При исследовании материала от здоровых детей, проживающих на одной из самых северных территорий СЗФО (Ненецкий автономный округ), нами также были выделены ЭВ CVB в большом количестве (эти результаты подробно изложены в главе 5 настоящего исследования). Из 23 энтеровирусов, выделенных от детей из различных ДДУ, 16 энтеровирусов (69,5%) относились к различным серотипам ЭВ CVB. В момент забора биоматериала ни у одного ребёнка не было отмечено симптомов ЭВИ. Это говорит о том, что вирусы CVB широко циркулируют среди населения и легко передаются при тесном бытовом контакте, однако симптомы заболевания развиваются лишь у некоторых индивидуумов, по тем или иным причинам особо восприимчивых к инфекции.

Штаммы вирусов CVB, циркулирующие на территориях СПб РЦ, генетически неоднородны. По результатам филогенетического анализа, проведённого для нуклеотидных последовательностей нескольких штаммов ЭВ CVB2 (рис. 4.19), они происходили из разных источников. Так, три штамма,

вызавшие случаи энтеровирусного менингита в Санкт-Петербурге, Архангельской области и Республике Коми в июле-августе 2013 г., достоверно группировались в один кластер со штаммами, выделенными в то же время в других регионах России. Два из трёх штаммов: из Санкт-Петербурга и Архангельской области, имели всего пять незначимых замен на расшифрованном участке генома VP1 длиной в 846 н.о., что говорит об их близком родстве. Штамм из Республики Коми отстоял от них довольно далеко. Штамм CVB2 (4711), ставший причиной острого вялого паралича в Вологодской области в 2012 г., достоверно группировался только со штаммом из Индии, который в 2010 г. вызвал острый вялый паралич в штате Uttar Pradesh, но на филогенетическом дереве отстоял от него достаточно далеко. Это позволяет предположить, что штамм из Вологды имел общего предка со штаммом из Индии.

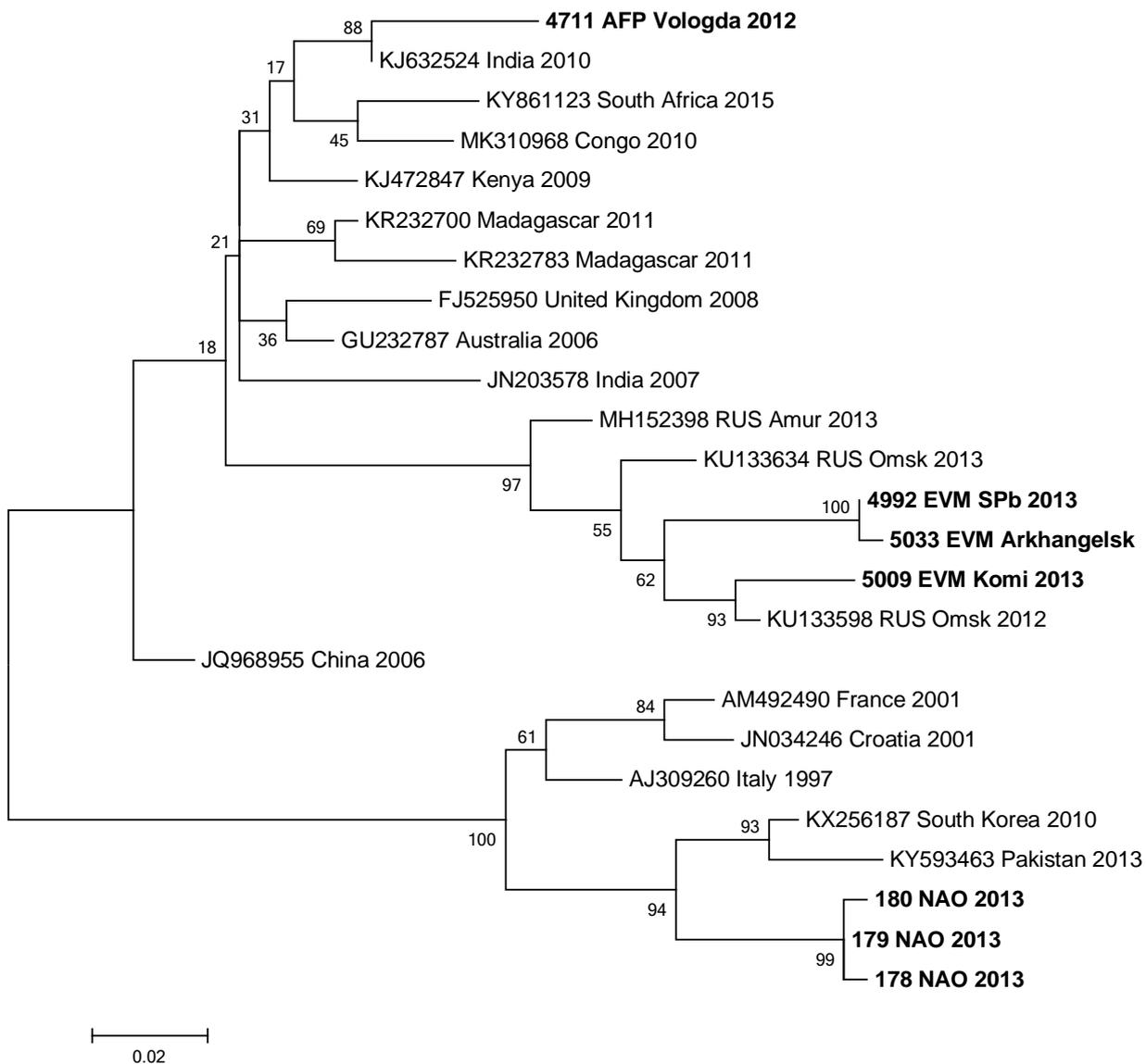


Рис. 4.19. Филогенетическое дерево для области генома VP1 энтеровирусов CVB2 (333 н.о.). Жирным шрифтом отмечены штаммы, выделенные на территориях СПб РЦ.

Три штамма CVB2, выделенные от здоровых детей из Ненецкого автономного округа, также оказались практически идентичными на исследованном участке длиной 333 нуклеотидных пар. Были выявлены только три нуклеотидные замены, которые привели к заменам аминокислот в белковой последовательности. Все три штамма были выделены у детей, посещающих одно ДДУ, изменялись независимо друг от друга, а ближе к изначальному штамму находился штамм номер 179. Это говорит о независимом изменении штаммов

вируса, имеющих общего предка, занесённого в детский коллектив. Данные штаммы были близкородственны штаммам CVB2 из Пакистана и Южной Кореи, выделенным в предыдущие три года.

Филогенетический анализ штаммов CVB3, выделенных от здоровых детей, приводится в главе 5 настоящего исследования (см. рис. 5.1). Он также показывает генетическую неоднородность штаммов этого серотипа, циркулирующих на территориях СПб РЦ.

Проведённое исследование показывает, что энтеровирусная инфекция является актуальной проблемой для территорий СПб РЦ. На протяжении шестилетнего периода наблюдения практически ежегодно на многих территориях имели место групповые заболевания и периодические подъёмы заболеваемости энтеровирусной инфекцией, этиологическими агентами которых становились энтеровирусы различных серотипов. Прослеживается смена серотипов: если в 2012-13 годах заболеваемость ЭВИ была чаще обусловлена энтеровирусами нескольких серотипов ЕСНО и CVB, то в 2016-17 гг. этиологическими агентами ЭВИ становились в большей степени ЭВ CVA преимущественно серотипов А4 и А6. Филогенетический анализ выделенных штаммов показал, что заболевания вызывались энтеровирусами, эндемичными для территорий РФ или завезёнными из других стран, при этом эволюция энтеровирусов в процессе их циркуляции происходила независимо друг от друга. Клинические формы энтеровирусной инфекции также отличались на разных территориях: на ряде территорий преобладал энтеровирусный менингит, на других чаще регистрировались экзантемные формы. К 2017 г. на многих территориях стало регистрироваться больше экзантемных форм ЭВИ, связанных с серотипами вирусов CVA.

ГЛАВА V. НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ ДЕТЕЙ ИЗ ГРУПП РИСКА

Вирусологическое исследование биологического материала от детей из групп риска является важной составляющей частью Программы ликвидации полиомиелита в Российской Федерации: надзор за циркуляцией полиовирусов среди детей из групп риска необходим для поддержания статуса РФ как страны, свободной от полиомиелита. Он проводится, чтобы доказать отсутствие в стране скрытой циркуляции диких и вакцинородственных полиовирусов. К группам риска относятся дети до 5 лет из семей мигрантов, вынужденных переселенцев, кочующих групп населения, дети из домов ребёнка и других закрытых детских учреждений [64].

5.1. Энтеровирусы, выделенные от детей из домов ребёнка

В целях изучения возможной циркуляции энтеровирусов среди здоровых детей в 2014 г. был собран фекальный материал у 164 детей, проживающих в домах ребёнка на трёх территориях СПб РЦ (г. Санкт-Петербург, Калининградская и Новгородская области). Результаты проведенного в Региональном центре вирусологического исследования позволили выявить факт скрытой циркуляции полиовирусов среди детей в одном из домов ребёнка, которая представляет угрозу здоровью воспитанников. Всего в доме ребёнка в Новгородской области было выделено 8 полиовирусов (один ПВ типа 1, четыре ПВ типа 2 и три ПВ типа 3). Все выделенные полиовирусы являлись вакцинными по результатам ВТД. В других домах ребёнка ПВ не были выявлены. Помимо полиовирусов во всех домах ребёнка были обнаружены неполиомиелитные энтеровирусы: один штамм CVA10, один штамм CVA14, 3 штамма CVA24 и не идентифицированный НПЭВ (табл. 9).

Результаты исследования проб от детей из домов ребёнка трёх территорий

Территория	Число исследованных проб	Выделено	
		ПВ абс / %	НПЭВ абс / %
г. Санкт-Петербург	50	0	4 / 8,0 3 CVA24
Калининградская обл.	45	0	1 / 2,2 CVA10
Новгородская обл.	69	8 / 11,6	1 / 1,4 CVA14
Всего	164	8 / 4,9	6 / 3,6

Особое значение представляет выявление вакцинных полиовирусов у детей из дома ребёнка Новгородской области. Вирусы были выделены у воспитанников в тот момент, когда вакцинация против полиомиелита в домах ребёнка должна была проводиться только инактивированной вакциной. Можно предположить, что вакцинные полиовирусы были занесены в дом ребёнка из разных источников. Полиовирусы типа 2 были выделены у не привитого воспитанника, недавно возвратившегося из хирургического стационара, где он, возможно, был инфицирован полиовирусом, находясь в контакте с недавно привитыми детьми. Полиовирусы типа 2 были выделены ещё у троих детей из той же группы. Передача полиовируса типа 2 от первого ребёнка произошла в силу постоянного тесного контакта между воспитанниками. У детей из других (разных) групп были выделены три полиовируса типа 3, причём в одной из групп, в которых циркулировал полиовирус типа 3, ещё у одного ребёнка был изолирован ПВ типа 1. Вероятнее всего, полиовирусы типа 1 и 3, были занесены в дом ребёнка недавно привитыми оральной полиовирусной вакциной детьми, ранее проживавшими в семьях, которые при поступлении в дом ребёнка не проходили карантин и были помещены сразу в группу к другим детям. Все выделявшие ПВ дети, за исключением одного, были привиты ИПВ и не имели какой-либо клинической симптоматики.

В доме ребёнка Санкт-Петербурга были обнаружены CVA24, отнесенные к виду С энтеровирусов, которые ранее не выявлялись на территориях СПб РЦ.

Результаты секвенирования участка генома VP1 трёх штаммов CVA24 показали их полную идентичность на исследуемом участке, что свидетельствует о происхождении из одного источника и дальнейшем распространении среди детей. Это позволило предположить, что циркуляция CVA24 в закрытом детском дошкольном учреждении связана с приёмом в данное учреждение ребенка – носителя данного энтеровируса, недавно прибывшего из южных стран, где нередко выявляются энтеровирусы вида С. Тесные контакты между детьми при отсутствии гигиенических навыков способствовали дальнейшему распространению энтеровируса данного серотипа среди воспитанников.

5.2. Энтеровирусы, выделенные от детей из детских коллективов

Помимо исследования материала, взятого от воспитанников домов ребёнка, было проведено исследование 100 проб от здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения (ДДУ) на одной из «молчащих» территорий СПб РЦ, находящейся на крайнем севере (Ненецкий автономный округ). Эта территория расценивалась как «молчащая», поскольку в течение нескольких предыдущих лет на ней не было зарегистрировано случаев ОВП. Вирусологическим методом из материала от детей были выделены один полиовирус типа 2 и 22 неполиомиелитных энтеровируса. Таким образом, положительные пробы составили 23% от общего количества исследованных проб (табл. 10). Процент выделения ЭВ в разных детских садах варьировал от 11,0 до 61,0%. Наибольшее число выделенных энтеровирусов принадлежали к CVB6, которые были изолированы в пяти из восьми детских учреждений, причём в одном ДДУ эти вирусы были выделены у 11 из 18 обследованных детей. В другом учреждении у четырёх детей были выделены энтеровирусы ЕСНО 6, которые довольно широко циркулируют на территориях РФ. В единичных случаях встречались НПЭВ серотипов ЕСНО 25 и 33. Лишь в двух детских садах из восьми НПЭВ у детей не были обнаружены.

Результаты исследования проб от детей из детских дошкольных учреждений Ненецкого автономного округа

№	ДДУ	Число детей	Число ЭВ		Серотипы ЭВ
			абсолют.	%	
1	№1 и 2	23	0	0	-
2	№3	11	3	27,3	3 CVB2
3	№4	18	11	61,0	6 CVB, 4 CVB3, 1 ЕСНО 25
4	№5	21	5	23,8	1 PV2, 4 ЕСНО 6,
5	№6	9	1	11,1	1 CVB3
6	№7	11	2	18,2	1 CVB4, 1 ЕСНО 33
7	№8	7	1	14,3	1 CVB4
Всего		100	23	23,0	

В одном ДДУ у пятикратно привитого против полиомиелита ребёнка был изолирован полиовирус типа 2, расследование показало, что этот ребенок имел домашний контакт с сестрой, недавно вакцинированной ОПВ. В целом штаммы CVB составили более 70% от всех выделенных НПЭВ, и как показано в таблице, в разных учреждениях были обнаружены CVB разных серотипов. В одном детском учреждении циркулировали вирусы CVB2 (выделено 3 штамма), в другом циркулировали вирусы CVB3 (выделено 4 штамма), а еще в двух ДДУ у детей было выделено по одному штамму CVB4. В двух учреждениях наряду с CVB было изолировано по одному штамму ЭВ ЕСНО 25 и 33.

Сообщений о случаях заболевания энтеровирусной инфекцией ни в одном из детских учреждений, вошедших в исследование, не было. Большой процент выделения НПЭВ от детей объясняется временем сбора проб: материал собирался в сентябре, в момент формирования детских коллективов, когда дети возвращались после летнего отдыха на юге, где они могли инфицироваться энтеровирусами. Дети-носители энтеровирусов принимались в детские учреждения, поскольку не имели клинической симптоматики. Впоследствии имело место распространение энтеровирусов контактно-бытовым путём среди детей в группах.

5.3. Энтеровирусы, выделенные от детей из семей мигрантов

В России в рамках Программы ликвидации полиомиелита уделяется особое внимание обследованию детей в возрасте до 5 лет, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту территорий. В 2002 году Европейский регион ВОЗ и Российская Федерация в его составе были сертифицированы как территории, свободные от циркуляции дикого полиовируса. Но в мире все ещё существуют страны, где дикий полиовирус продолжает циркулировать, несмотря на усилия ВОЗ по его ликвидации. В 2010 году в Таджикистане была зафиксирована крупная вспышка полиомиелита, вызванная диким полиовирусом типа 1, импортированным из Индии [8]. Этот полиовирус также был импортирован в соседние страны, в том числе в Российскую Федерацию, где было зарегистрировано семь случаев полиомиелита у граждан Таджикистана и Узбекистана и семь случаев полиомиелита у российских граждан. В этот период в вирусологической лаборатории СПб РЦ из материала от здоровых детей-мигрантов, прибывших из Таджикистана на курируемые территории, было выделено 4 диких полиовируса типа 1. Ещё одной серьёзной проблемой, осложняющей реализацию Программы ликвидации полиомиелита, является циркуляция вакцинородственных полиовирусов. Такие вирусы могут образоваться в процессе длительной репликации в одном организме или множественной передачи от одного человека другому, когда штамм в результате нуклеотидных замен приобретает нейровирулентность, свойственную диким полиовирусам. В целях предупреждения импортирования диких полиовирусов, вакцинородственных полиовирусов и во избежание ухудшения ситуации по полиомиелиту все Субнациональные лаборатории РФ регулярно исследуют фекальный материал от детей-мигрантов, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту регионов. Опасность представляют и дети из кочующих групп населения, способных переносить вирусы с одной территории на другие, они также входят в группу риска.

На территории, курируемые СПб РЦ, преимущественно приезжают дети трудовых мигрантов из стран СНГ, а также дети из южных республик Российской

Федерации с осложнённой эпидемической ситуацией. В таблице 11 представлены результаты обследования детей из семей мигрантов в 2012-2017 годах. Всего за этот период было обследовано 712 детей. С 2013 по 2015 год у детей из семей мигрантов процент выделения ПВ колебался от 1,7% до 4,8%, в 2012, 2016 и 2017 годах полиовирусы не были выделены. Все выделенные полиовирусы по результатам ВТД относились к вакцинным штаммам. Процент обнаружения НПЭВ варьировал от 3,9% до 13,3%, составив в среднем 9,7%.

Таблица 11

Результаты обследования детей из семей мигрантов на полиовирусы и
неполиомиелитные энтеровирусы

Год	Число обследованных	Из них с выделением	
		ПВ (%)	НПЭВ (%)
2012	74	0	9 (12,2)
2013	112	3 (2,7)	11 (9,8)
2014	103	5 (4,8)	4 (3,9)
2015	119	2 (1,7)	9 (7,6)
2016	196	0	26 (13,3)
2017	108	0	10 (9,3)
Всего	712	10 (1,4)	69 (9,7)

Большая часть обследованных детей прибыла на территории СПб РЦ из Узбекистана, Таджикистана, Украины и Киргизии (табл. 12). Также на территории СПб РЦ прибывали дети из Республики Дагестан и Чеченской Республики Северо-Кавказского федерального округа РФ, часть детей относилась к кочующим группам населения. Северо-Кавказский федеральный округ является частью Российской Федерации – страны, которая давно свободна от дикого полиовируса. Тем не менее этот округ считается территорией риска из-за связи его населения с населением соседних стран Ближнего Востока (Афганистан, Пакистан), где до сих пор продолжается циркуляция дикого полиовируса. Кроме

того, с территорий округа приезжают непривитые против полиомиелита дети и дети без сведений о вакцинации, поэтому в рамках Программы ликвидации полиомиелита этим детям уделяется такое же внимание, как детям, прибывшим из неблагополучных по полиомиелиту регионов мира. В директивных документах РФ (МУ 3.1.1.360-08 «Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и ОВП» [64], СП 3.1.1.2951-11 «Профилактика полиомиелита» [38]) прописана необходимость обследования детей до 5 лет из Чеченской Республики и Республик Ингушетия и Дагестан. Из отдалённых регионов мира, таких как Азия и Африка, на территории СПб РЦ прибывало сравнительно мало детей.

Таблица 12

География обследованных детей из семей мигрантов

Страна, регион	Количество обследованных	% от общ. количества	Выделенные энтеровирусы
Узбекистан	165	23,2	CVA4, CVA10, CVB, E11, EV75, NPEV, Parechovirus
Таджикистан	139	19,5	CVA3, CVA10, CVA13, CVA17, CVB, E6, E10, E13, E29, E30, EV75, EV120, NPEV
Республика Дагестан	85	11,9	CVA, CVA10, E4, E11, E18, E29, E30, CVB, NPEV
Украина	62	8,7	NPEV
Киргизия	48	6,7	CVA, CVA24, E11, NPEV
Чеченская Республика	30	4,2	CVA4, CVA1-6
Казахстан	25	3,5	CVA21
Кабардино-Балкарская Республика	22	3,1	CVB3, E11, NPEV
Кочующие группы	22	3,1	CVA17, EVC
Азербайджан	21	2,9	EV99, NPEV
Афганистан	13	1,8	EV99
Армения	5	0,7	-
Молдова	4	0,6	NPEV
Туркмения	4	0,6	-
Египет	4	0,6	-

Индия	1	0,2	CVB3
Прочие *	17	2,4	-
Нет данных о стране	45	6,3	-
Всего	712	100	

* Прочие страны и регионы РФ: Карачаево-Черкессия, Ингушетия, Северная Осетия, Монголия, Грузия, Пакистан, Сьерра-Леоне, Ирак, Ливия, Сирия, Турция, Вьетнам, ОАЭ

Несмотря на то, что самое большое количество обследованных детей прибыло на территории СПб РЦ из Узбекистана, процент выделения энтеровирусов у этих детей был меньше, чем у детей из двух других неблагополучных регионов (табл. 13). От прибывших из Узбекистана детей ЭВ выделялись только в 7,3% проб, тогда как у детей из Таджикистана энтеровирусы выделялись статистически достоверно чаще: в 16,5% проб ($p < 0,05$). ЭВ у детей-мигрантов из Республики Дагестан были выделены в 11,8% проб. Спектр выделенных серотипов энтеровирусов также был шире у детей, прибывших из Таджикистана (было установлено 12 различных серотипов ЭВ).

Таблица 13

Процент выделения неполиомиелитных энтеровирусов у детей, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту регионов

Страна, регион	Количество обследованных	Количество положительных проб	% положительных проб	Выделенные энтеровирусы
Узбекистан	165	12	7,3	CVA4, CVA10, CVB, E11, EV75, NPEV, Parechovirus
Таджикистан	139	23	16,5	CVA3, CVA10, CVA13, CVA17, CVB, E6, E10, E13, E29, E30, EV75, EV120, NPEV
Республика Дагестан	85	10	11,8	CVA, CVA10, E4, E11, E18, E29, E30, CVB, NPEV

От детей из семей мигрантов были изолированы как циркулирующие на территориях СПб РЦ энтеровирусы (CVA4, A10, CVB, Echoviruses 6, 11, 13, 30), так и энтеровирусы, которые ранее у детей резидентов не были обнаружены. К последним относятся CVA13, A17 и A24, ECHO 18 и 29, EV 75, 99 и 120.

Напротив, типичный для территорий Российской Федерации ЭВ ЕСНО6 был выделен только у одного из обследованных детей из семьи мигрантов. Энтеровирус ЕСНО 30, широко циркулирующий и вызывающий периодические подъёмы ЭВИ на территориях России и детектируемый у детей-резидентов с синдромом ОВП, в единичных случаях был обнаружен у детей, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту территорий. EV 71, которые выделялись от больных ОВП и ЭВИ, ни у одного ребенка из семей мигрантов выделить не удалось.

Важно отметить, что энтеровирусы, которые были обнаружены у детей из семей мигрантов, относились к трём видам энтеровирусов. Так, вирусы CVA3 и EV120 относятся к виду А энтеровирусов, вирусы ЕСНО 18 и 29, EV75 – к виду В, а вирусы CVA13, A17, A21 и A24, EV99 относятся к виду С энтеровирусов. Энтеровирусы вида С на территориях СПб РЦ ранее не выделяли. Однако вирусы именно этого вида имеют большое эпидемиологическое значение, поскольку к этому виду относятся и полиовирусы. В научной литературе описаны случаи вспышек вакциноассоциированного паралитического полиомиелита, этиологическими агентами которых являлись штаммы - рекомбинанты полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов вида С [113]. За рассматриваемый период только один вирус вида С энтеровирусов - CVA21 - был выделен от ребенка-резидента (от больного с синдромом ОВП из Мурманской области).

CVA21 ранее не привлекал пристального внимания исследователей. Но в 2016 году в сообщении китайских учёных была описана вспышка острой респираторной инфекции, вызванной CVA21. Это был первый зафиксированный случай быстрой передачи этого вируса от человека к человеку, что свидетельствует о возможной опасности при попадании вируса CVA21 в детский коллектив [198].

Энтеровирус CVA3, изолированный из материала от ребенка, прибывшего из Таджикистана, на наших территориях не выделяли, хотя он был обнаружен на некоторых территориях РФ [12]. Энтеровирус ЕСНО 18, выделенный в 2012 г. от

ребёнка из Республики Дагестан, до 2017 г. на территориях региона не был обнаружен. Он нечасто встречался и на других территориях России: например, описаны случаи его выделения на Дальнем Востоке [36, 52]. В 2017 г. энтеровирус этого типа вызвал подъём заболеваемости энтеровирусным менингитом в Саратовской области [43], однако штаммы 2017 года из Саратова и штамм от прибывшего из Дагестана ребёнка при филогенетическом анализе оказались в разных кластерах, то есть они генетически различны (см. рис. 4.15).

Нами были выявлены два случая одновременной персистенции дикого полиовируса и неполиомиелитного энтеровируса у двух здоровых детей, прибывших из Таджикистана в 2010 году, когда имела место вспышка полиомиелита, вызванная диким полиовирусом типа 1. При исследовании в Субнациональной лаборатории у этих детей были выделены полиовирусы типа 1, в результате ВТД оба полиовируса были классифицированы как дикие полиовирусы. После дополнительной иммунизации оральной полиомиелитной вакциной оба ребёнка перестали выделять дикие полиовирусы, однако при повторном исследовании в фекальном материале были обнаружены неполиомиелитные энтеровирусы. С помощью молекулярного анализа один из них был впоследствии идентифицирован как CVA13, другой - как EV75. Очевидно, НПЭВ в организме этих детей персистировали раньше, но поскольку дикий полиовирус размножается очень активно, он подавляет размножение любых других энтеровирусов и выделить НПЭВ вирусологическим методом при наличии в пробе дикого полиовируса маловероятно. Поэтому неполиомиелитные энтеровирусы не были обнаружены, пока размножение полиовируса не было подавлено благодаря иммунизации живой полиомиелитной вакциной.

5.4. Филогенетический анализ энтеровирусов, выделенных от детей из групп риска

Несмотря на то, что у здоровых детей, проживающих в разных регионах мира, могут выделяться энтеровирусы одних и тех же серотипов, при секвенировании генома этих вирусов можно обнаружить значительные различия в переменных частях генома. Сопоставление нуклеотидной последовательности генома вируса с геномами других вирусов того же серотипа, выделенных на конкретной территории, а также с имеющимися в базе данных GenBank позволяет сделать предположение о происхождении вируса: например, завезён ли он с другой территории.

Так, на рис. 5.1 отражены филогенетические отношения штаммов ЭВ CVB3, выделенных из различных источников. Штаммы поделились на две группы. Четыре штамма CVB3 (217, 219, 220 и 230), выделенные от детей, посещающих один детский сад в Ненецком автономном округе, группировались в один кластер и имели минимальные отличия в последовательности нуклеотидов (одна значимая замена у штамма CVB3-219). Небольшое количество нуклеотидных замен говорит об однократном заносе этого вируса и дальнейшем его распространении в детском коллективе, во время которого произошли незначительные мутации в геноме ЭВ. Штамм CVB3, выделенный от прибывшего из Таджикистана ребёнка, несколько отличался от штаммов, выделенных от здоровых детей, посещающих ДДУ в НАО. Но все пять энтеровирусов CVB3 родственны европейским штаммам. Недостаток сведений о циркуляции НПЭВ в странах СНГ не позволяет сказать с точностью, был ли этот штамм завезён из Таджикистана или другого региона РФ.

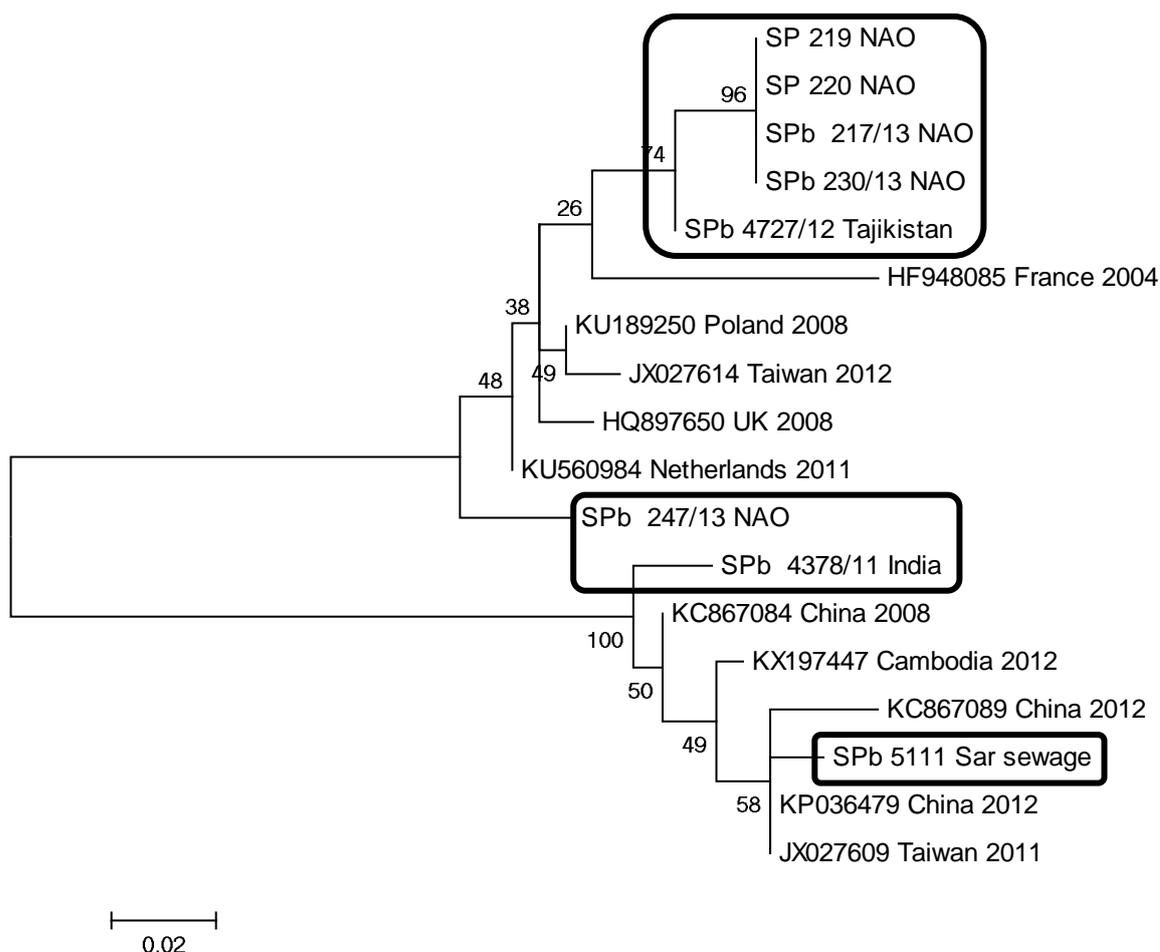


Рис. 5.1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагмента VP1 генома CVB3 (198 н.о.). Выделенные лабораторией СПб РЦ штаммы выделены рамкой.

Вирус CVB3 (247/13), выделенный от ребёнка из другого детского учреждения в НАО, достоверно не группировался ни с одной из найденных последовательностей, что свидетельствует о независимом заносе. Штаммы, выделенные от прибывшего в Архангельскую область из Индии ребёнка (4378/11) и из сточной воды, забранной в г. Саратов в 2013г. (5111), были родственны ЭВ из Юго-Восточной Азии.

Филогенетический анализ штаммов вирусов CVB2, выделенных от здоровых детей, приводится в главе 2 настоящего исследования (см. рис. 4.19).

От трёх детей, прибывших из Таджикистана в 2010 г., были выделены три CVA13 (рис. 5.2). По результатам поиска похожих последовательностей в GenBank штамм 3962 не был близко родственен другим штаммам, процент

идентичности составлял не более 85%. Штамм 3994 достоверно группировался с вирусом, выделенным в Китае в 2013 году. Штаммы 3962 и 3997 достоверно не группировались с последовательностями, имеющимися в базе данных. Стоит уточнить, что количество последовательностей вирусов CVA13 в GenBank чрезвычайно мало по сравнению с последовательностями энтеровирусов других серотипов, что затрудняет проведение молекулярного анализа. Имеющиеся в базе данных последовательности были получены в таких странах, как Китай, Мадагаскар, Камерун и Бангладеш. Ни одного штамма из Европы не было найдено. В РФ CVA13 выделялись в единичных случаях (например, в 2011 г. от здорового ребёнка в г. Екатеринбурге [39], в 2016 г. от больного ЭВИ в Южном федеральном округе [9]). Следовательно, в Таджикистан эти вирусы могли быть завезены из стран Африки или Азии, но дальнейшее их распространение на территориях СПб РЦ не произошло.

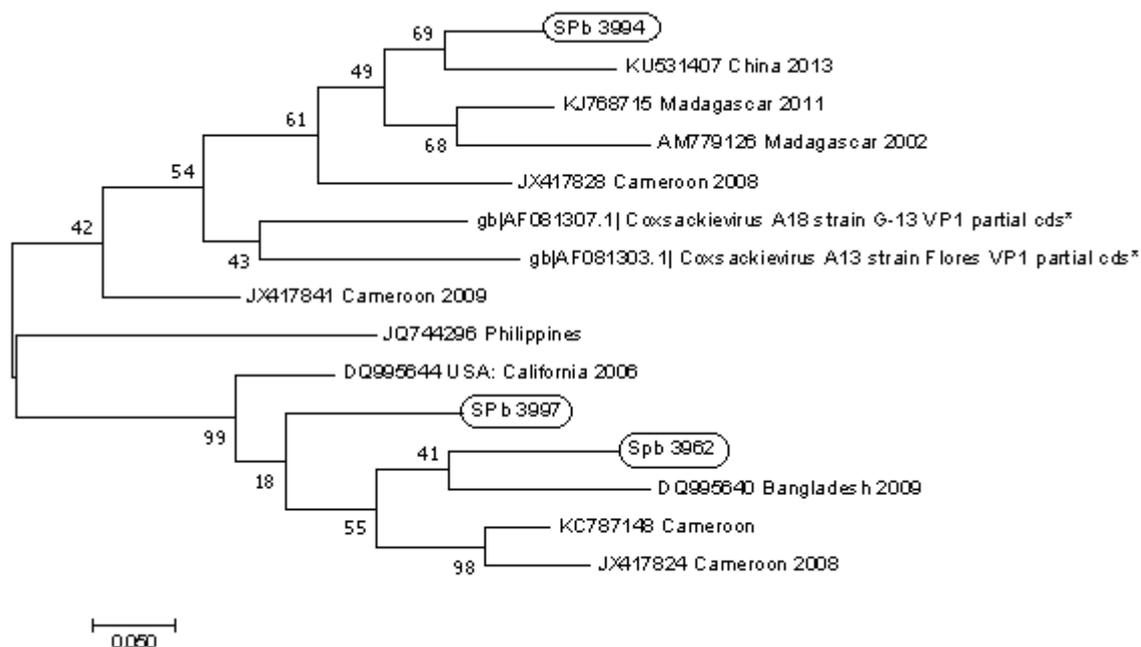


Рис. 5.2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагмента VP1 генома вируса CVA13. Выделенные в СПб РЦ штаммы выделены рамкой. В филограмму включены референсные последовательности CVA13 и CVA18, поскольку CVA18, считавшийся отдельным серотипом, теперь относится к CVA13.

Таким образом, удалось установить циркуляцию энтеровирусов среди

здоровых детей из групп риска (проживающих в домах ребёнка, прибывших из неблагополучных территорий, детей из кочующих групп населения). От детей, проживающих в доме ребёнка в Новгородской области, было выделено восемь штаммов вакцинных полиовирусов, хотя вакцинация оральной полиомиелитной вакциной в домах ребёнка была прекращена в 2006 г. Это доказывает необходимость строгого соблюдения карантина для воспитанников, только что принятых в коллектив, а также тех, кто возвращается в группу из дневных стационаров. Кроме того, у здоровых детей до 5 лет из детских коллективов было обнаружено бессимптомное носительство энтеровирусов. Филогенетический анализ выделенных штаммов показал, что некоторые штаммы одного серотипа, выделенные у детей, посещающих один и тот же детский сад, являются близкородственны друг другу и происходят из одного источника. Поскольку забор биологического материала проводился в осенние месяцы, вероятнее всего энтеровирусы были занесены в детские учреждения северной территории детьми, возвращающимися с летнего отдыха, после чего вирусы распространялись в группах контактно-бытовым путём вследствие низких гигиенических навыков у детей. У здоровых детей из семей мигрантов, прибывавших на территории СПб РЦ преимущественно из стран СНГ и южных республик РФ, были обнаружены энтеровирусы, как циркулирующие, так и не встречающиеся на территориях региона. В частности, энтеровирусы вида С, которые в период наблюдения не были выделены у детей-резидентов.

ГЛАВА VI. ВЫДЕЛЕНИЕ ЭНТЕРОВИРУСОВ ИЗ ПРОБ СТОЧНОЙ ВОДЫ

Исследование проб из окружающей среды (неочищенных сточных вод) является важным элементом надзора за полиовирусами на этапе ликвидации полиомиелита. Оно позволяет выявить дикие и вакцинородственные полиовирусы, особенно при отсутствии зарегистрированных случаев заболевания ОВП. Кроме того, мониторинг сточных вод даёт представление об энтеровирусах, циркулирующих среди населения данной территории. Исследования регламентированы методическими указаниями МУ 3.1.1.2363-08 [65] и МУ 4.2.2357-08 [33]. В плановом порядке на содержание НПЭВ исследуются сточные воды, поступающие на очистные сооружения и сточные воды на этапах очистки и обеззараживания. По эпидемическим показаниям проводится исследование сточных вод, воды поверхностных водоемов, которые используются для целей рекреации и в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения, питьевой воды и др.

6.1. Результаты вирусологического исследования проб, взятых из объектов окружающей среды на территориях СПб РЦ

Ежегодно в «Центрах гигиены и эпидемиологии» курируемых территорий исследовалось более 1000 проб сточной воды (рис. 6.1), взятых в установленных точках водоочистных сооружений. Всего было исследовано 8214 проб сточной воды. Проведён анализ результатов исследования проб сточной воды 13 территорий кроме Ненецкого автономного округа, поскольку за рассматриваемый период там было исследовано всего семь проб сточной воды. Больше всего проб (1913 шт.) было исследовано в 2017 г. Полиовирусы были выделены в среднем в 2,3% проб, процент выделения неполиомиелитных энтеровирусов варьировал от 8% в 2013г до 5,3% в 2014 г. и в среднем составил 6,7%. Полиовирусы регулярно поступают в систему городской канализации, поскольку плановая иммунизация в РФ согласно национальному календарю профилактических прививок проводится с использованием двух вакцин: инактивированной и оральной, содержащей живые полиовирусы. Неполиомиелитные энтеровирусы попадают в сточную воду

либо от больных энтеровирусной инфекцией, либо от здоровых носителей этих вирусов. Дети, привитые оральной полиовакциной, могут экскретировать вакцинные полиовирусы в среднем до двух месяцев после вакцинации.

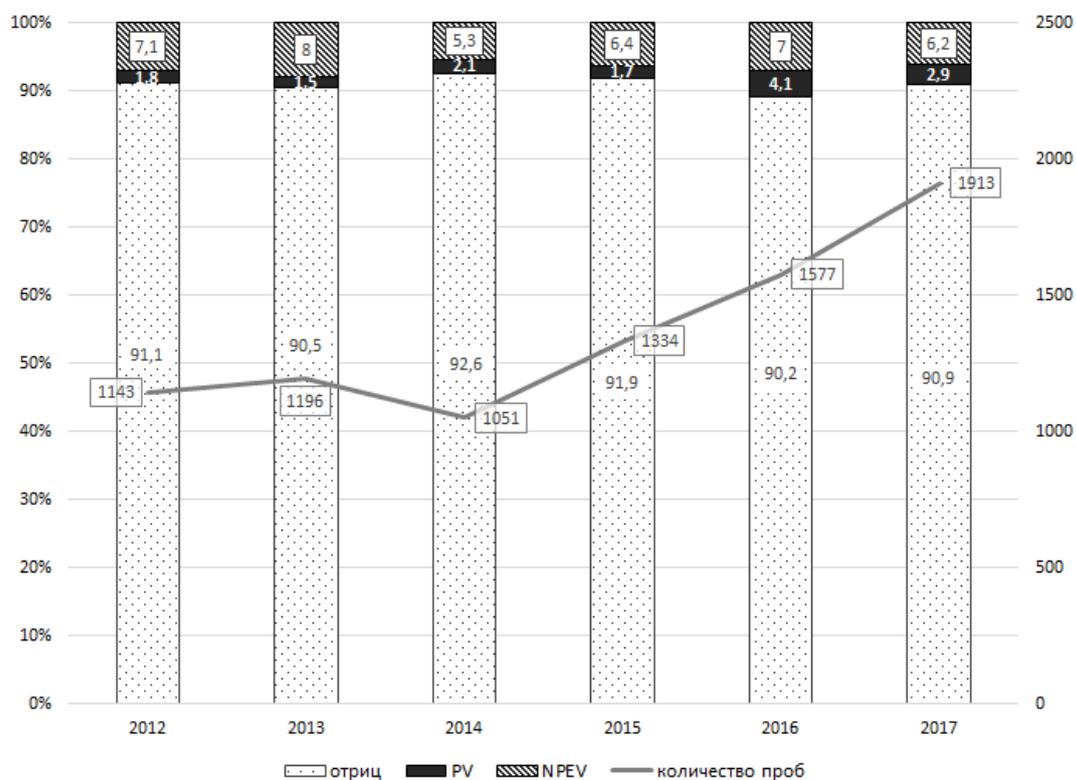


Рис. 6.1. Процент выделения полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов из проб сточной воды, исследованных в ФБУЗ 13 территорий в 2012-2017 гг.

В РЦ поступали концентраты сточной воды для идентификации и изоляты для подтверждения результатов лабораторий ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии», всего в количестве 273 проб (табл. 14). Полиовирусы были выделены из 104 проб (42,6%). Все выделенные штаммы полиовирусов являлись вакцинными. Неполиомиелитные энтеровирусы были выделены из 58 проб (21,8%). Процент выделения НПЭВ колебался от 11,8% в 2013 г. до 32,1% в 2015 г. Результаты, полученные в СПб РЦ, учитывались при заполнении документации на подтверждение свободного от полиомиелита статуса территорий и вошли в общую оценку выделения НПЭВ на территориях региона, представленную в диссертационном исследовании.

Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов из проб, поступивших для подтверждения и идентификации в СПб РЦ в 2012-2017 гг.

Год	Число проб сточной воды	Число выделенных ПВ	Процент выделения ПВ	Число выделенных НПЭВ	Процент выделения НПЭВ
2012	65	19	29,2%	17	26,2%
2013	34	14	41,2%	4	11,8%
2014	31	19	61,3%	8	25,8%
2015	28	18	64,3%	9	32,1%
2016	55	18	32,7%	11	20,0%
2017	60	16	26,7%	9	15,0%
Всего	273	104	42,6%	58	21,8%

Серотипы большинства НПЭВ, найденных в пробах сточной воды, были установлены. Так, в **2012 г.** (рис. 6.2) из проб сточной воды были выделены преимущественно ЭВ CVB (44,5%), ЕСНО 30 (9,9%) и ЕСНО 6,7 - их совместная доля составила 10,9%. ЭВ CVA выделялись в незначительном количестве (3%). Из других НПЭВ, выделенных в этом году, можно отметить единичные находки ЕСНО 3, 13, 25 и EV70. В следующем, **2013** году (рис. 6.2) доля ЭВ CVB снизилась до 26,2%. Увеличилось число других серотипов энтеровирусов, прежде всего серотипа ЕСНО 30, доля которого составила 17,5%. Более частое, чем в другие периоды наблюдения, выделение ЭВ ЕСНО 30 было связано с подъёмом заболеваемости ЭВИ на многих территориях региона и России в целом, что было обусловлено завозом ранее не циркулировавших в РФ штаммов ЭВ ЕСНО 30 генотипа h из Китая. Доля других ЭВ ЕСНО составила для ЕСНО 6 и 7 - 13,6%, что несколько выше, чем в 2012 г., а для ЕСНО 11 и 13 - 15,5%. Процент выделения ЭВ CVA увеличился до 8,7%.

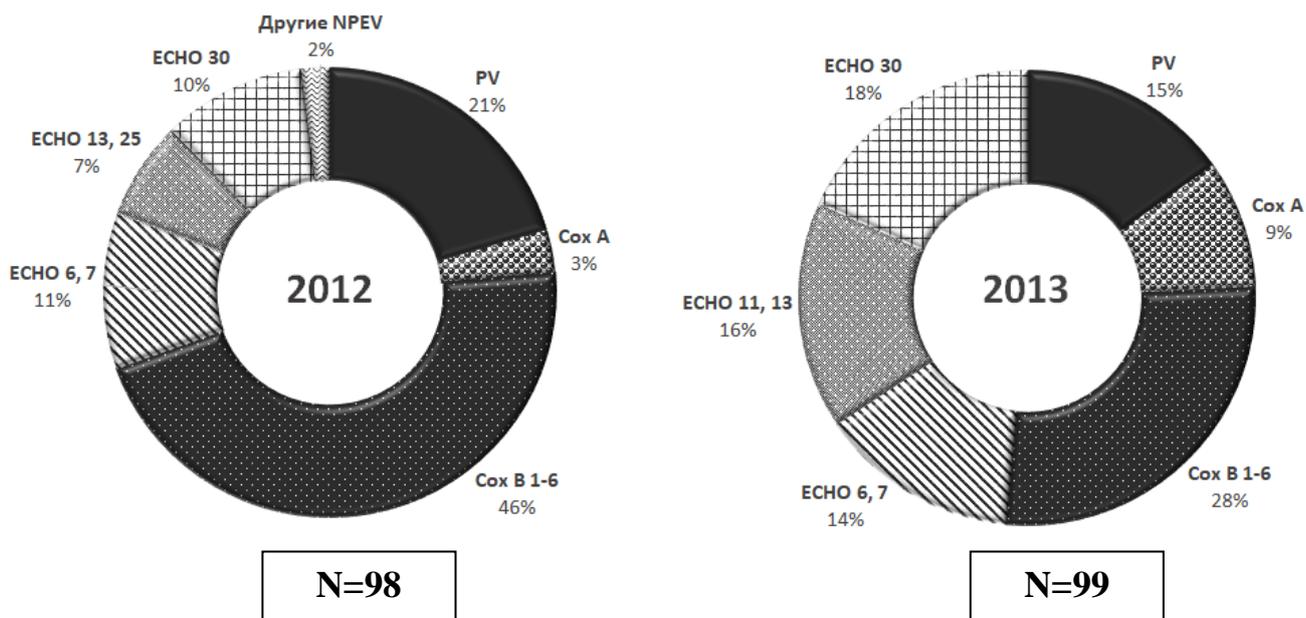


Рис. 6.2. Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов из проб сточной воды на территориях СПб РЦ в 2012 и 2013 гг.

В 2014 г. (рис. 6.3) как и в 2012 г. из проб сточной воды чаще других были выделены ЭВ CVB (40,0%). Доля ЭВ CVA возросла по сравнению с предыдущими годами и составила 11,3%, оказавшись равной доле ЭВ ЕСНО 30. В 2015 г. количество изолированных из проб сточной воды ЭВ CVA уменьшилось до 4,9%, однако было выделено больше, чем в предыдущие годы, ЭВ серотипов ЕСНО 11 и 13 (20,6%). Доля ЭВ CVB осталась по-прежнему большой и составила 33,3%. ЭВ ЕСНО 6 и 7, а также ЭВ других серотипов ЕСНО (3, 5, 29, 31) в этом году были выделены в редких случаях.

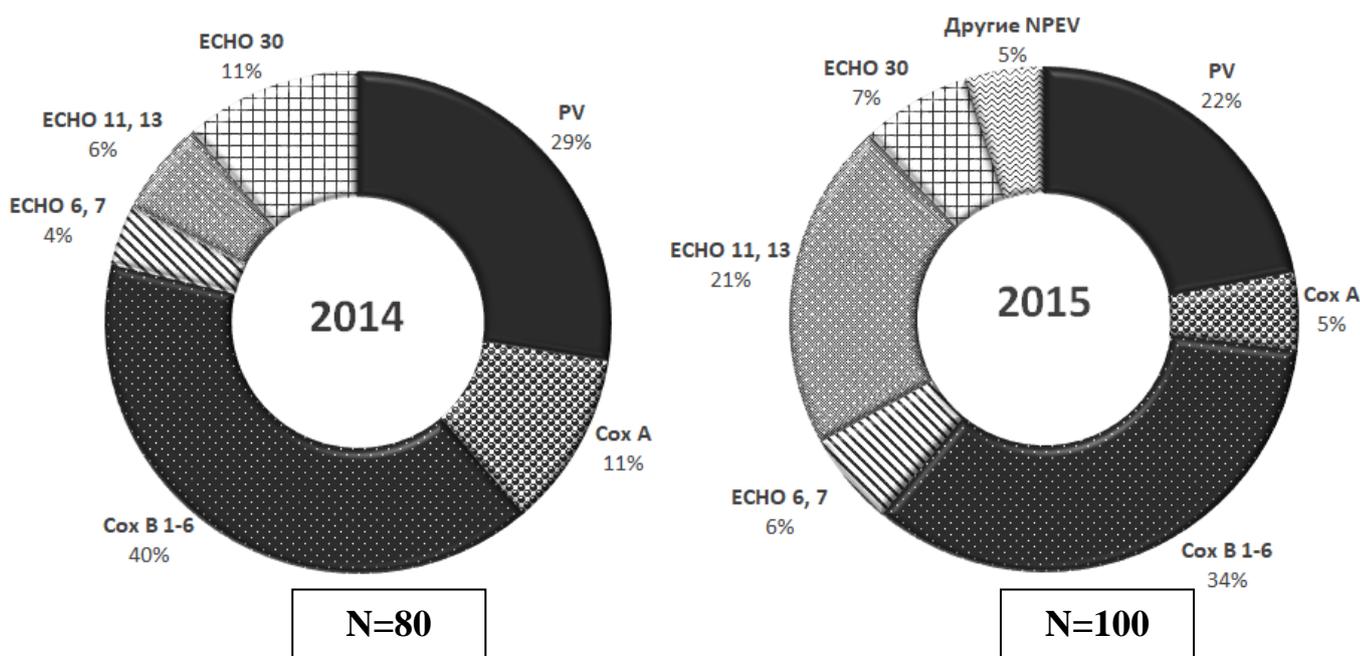


Рис. 6.3. Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов из проб сточной воды на территориях СПб РЦ в 2014 и 2015 гг.

В 2016 г. и 2017 г. (рис. 6.4) спектр выделенных из проб сточных вод энтеровирусов оказался похожим. В 2016 г. на территориях СПб РЦ было выделено больше всего полиовирусов, их доля составила 29%. Это связано с переходом Российской Федерации на использование для иммунизации против полиомиелита бивалентной ОПВ вместо трёхвалентной согласно плану ВОЗ [191] и активным применением остатков трёхвалентной ОПВ до момента окончания её применения. На втором месте по частоте выделения оказались ЭВ CVB: 26,4% в 2016г., 24,6% в 2017г., на третьем – ЭВ ECHO 30 (8,6% и 9,7% соответственно). ЭВ CVA были выделены из 6,9% и 10,3% проб соответственно. Прочие ЭВ (ECHO 3, 8, 20, 29, EV70, EV76) в эти годы выделялись в незначительном количестве.

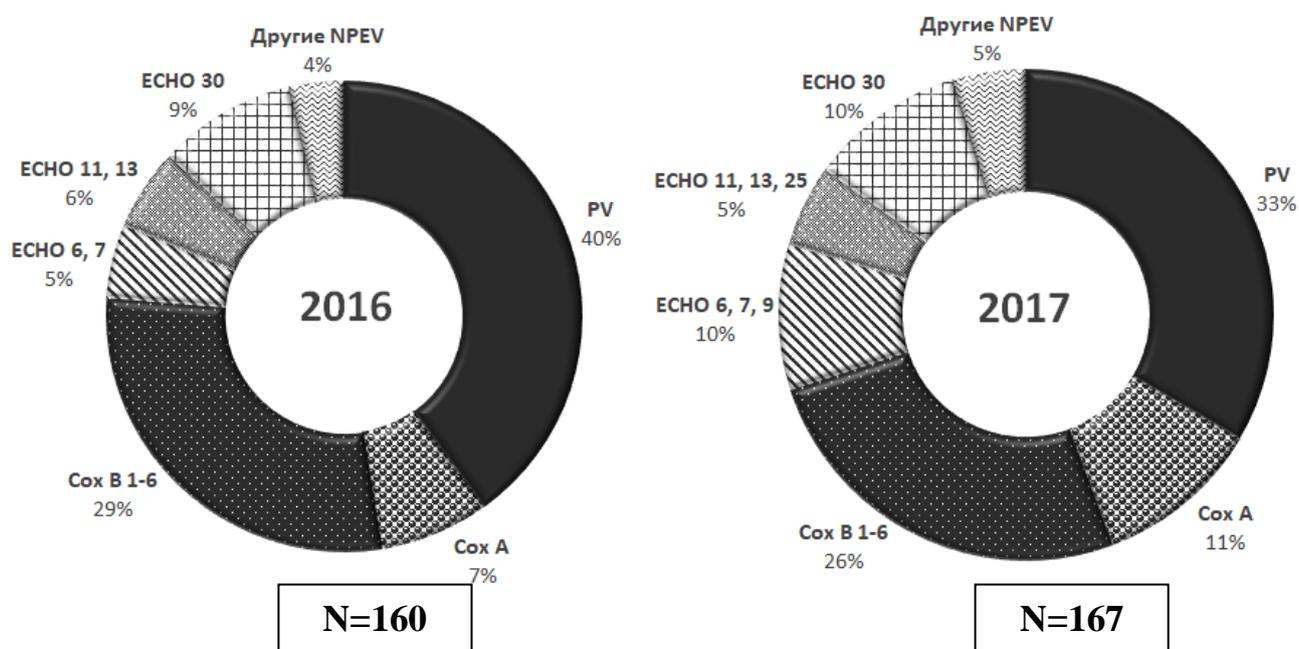


Рис. 6.4. Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов из проб сточной воды на территориях СПб РЦ в 2016 и 2017 гг.

В целом за шестилетний период наблюдения (рис. 6.5) в пробах сточной воды полиовирусы составили четверть от общего числа выделенных энтеровирусов. Среди неполиомиелитных энтеровирусов в наибольшем количестве из проб сточной воды выделялись CVB (30,9%). Доля ЭВ CVA составила всего 7,6% и оставалась низкой даже в годы, когда эти вирусы массово выделялись от больных энтеровирусной инфекцией. ЭВ ЕСНО 30 в среднем выделялись из 10,5% образцов. ЭВ ЕСНО 6, 7, 9, 11, 13 и 25 из проб сточной воды выделялись чаще, чем от больных энтеровирусной инфекцией. Помимо перечисленных были идентифицированы ЭВ ЕСНО других серотипов: 3, 5, 8, 20, 29 и 31, а также EV70 и EV76. EV71 из сточной воды в рассматриваемый период не выделялся. Неидентифицированным остался 31 энтеровирус, что составило 4,2% от общего количества выделенных ЭВ.

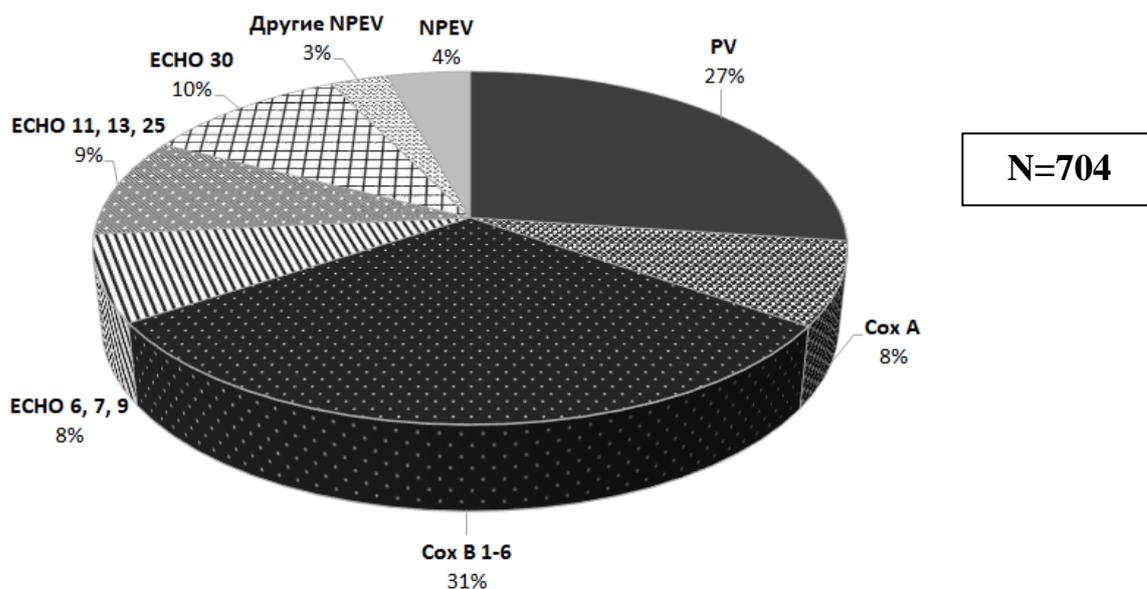


Рис. 6.5. Выделение полиовирусов неполиомиелитных энтеровирусов из проб сточной воды, собранных на 13 территориях СПб РЦ в 2012-2017 гг.

6.2. Сравнение спектра энтеровирусов, выделенных от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды на территориях СПб РЦ

Поскольку единственным резервуаром энтеровирусов является человек, во внешнюю среду эти вирусы попадают только с биологическим материалом от человека. В сточной воде ЭВ выживают в течение месяца, следовательно, мониторинг резервуаров сточных вод позволяет выявить скрытую циркуляцию энтеровирусов, которые обычно остаются вне поля зрения, т.к. не вызывают клинических признаков заболевания.

Во время подъёмов заболеваемости энтеровирусной инфекции на территориях вирусы серотипа, вызвавшего подъём, часто обнаруживаются и в сточной воде. Так, во время повышения заболеваемости ЭВИ, в том числе энтеровирусным менингитом, в Костромской области в 2016 г., в сточной воде обнаруживались ЭВ того же серотипа (ЕСНО 30), которые были выделены от больных.

Разнообразие типов неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных из сточной воды, в целом уступает разнообразию типов, встречающихся у больных энтеровирусной инфекцией. Если сравнить доли выделенных за 6 лет

энтеровирусов от больных ЭВИ и из окружающей среды (рис. 6.6), окажется, что для энтеровирусов одних серотипов они отличались, для других - были относительно близки. В сточной воде реже встречались ЭВ СVA (11,1% против 32,9% у больных ЭВИ ($p < 0,05$)) и совсем не встречались вирусы EV71, даже в те годы, когда этот вирус циркулировал на территориях региона. Из проб сточной воды чаще выделялись вирусы ЕСНО 11, 13 и 25 (13,3% против 4,7% у больных ЭВИ), что говорит о том, что эти вирусы реже вызывают инфекционный процесс, чем, например, вирус ЕСНО 30, и в основном обуславливают бессимптомное носительство. ЭВ CVB были выделены из большего числа проб сточной воды (44,9%) по сравнению с выделением их у больных ЭВИ (27,4%).

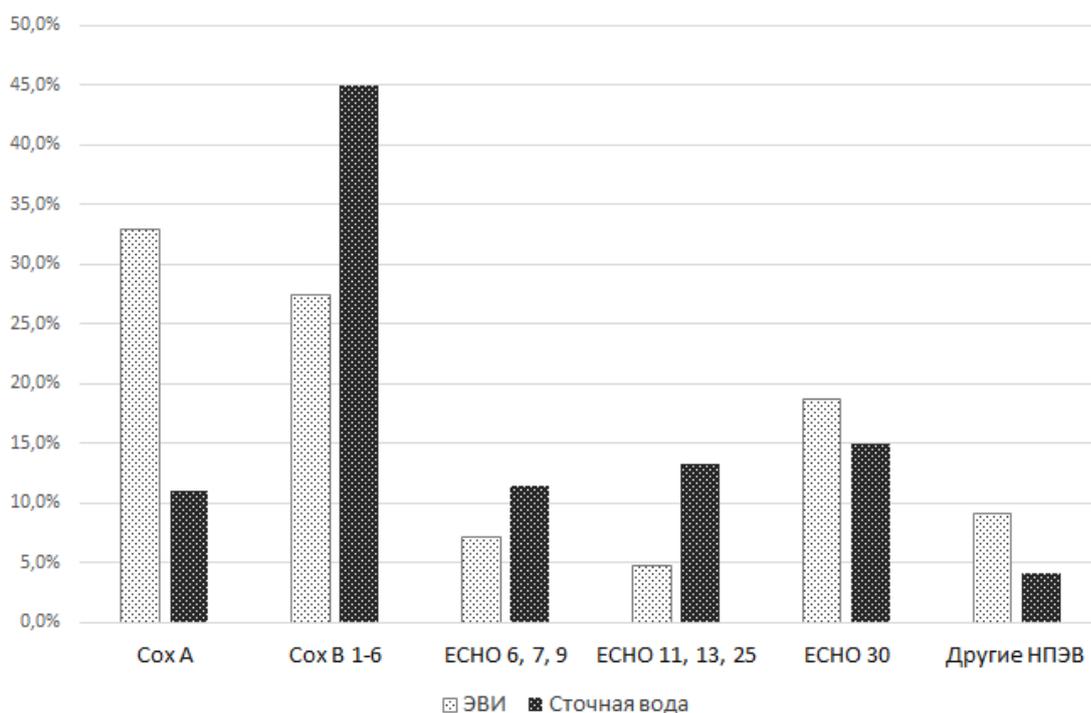


Рис. 6.6. Сравнение процента выделения НПЭВ от больных ЭВИ и из проб сточной воды, 2012-2017 гг.

Ретроспективно корреляция между отдельными, наиболее распространёнными на территориях СПб РЦ серотипами энтеровирусов прослеживается ещё лучше. Контроль за наличием энтеровирусов в пробах сточной воды на территории РФ ведётся с 2006 года в рамках дополнительного надзора за циркуляцией полиовирусов, что позволяет сравнить выделение

энтеровирусов из двух источников: от человека и из окружающей среды. Так, кривая выделения ЭВ ЕСНО 6 из сточной воды практически полностью повторяет кривую выделения этих же вирусов из материала от больных ЭВИ, только с более сглаженными пиками (рис. 6.7). Особенно это заметно по 2011 и 2016 годам. Коэффициент корреляции составил 0,83, что говорит о сильной прямой связи.

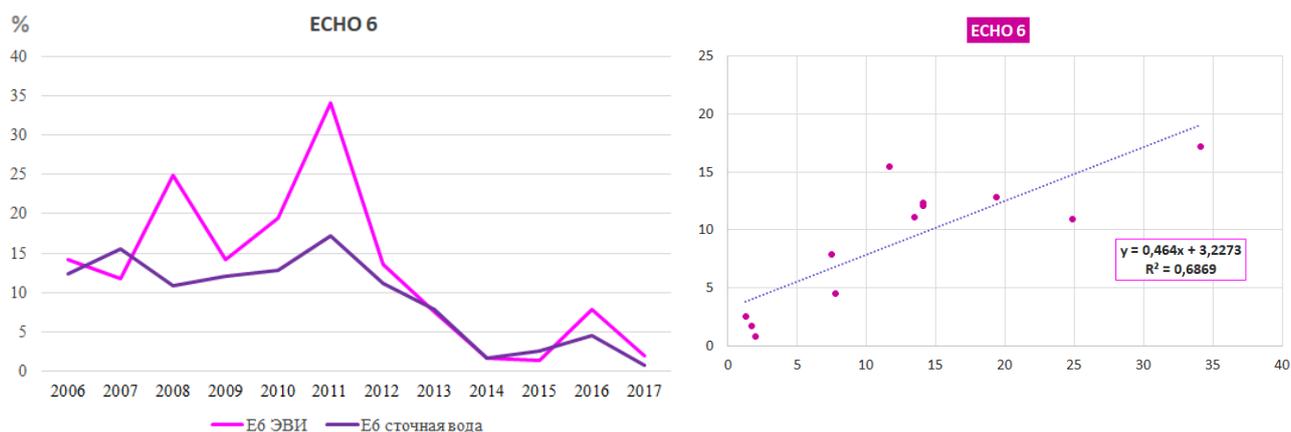


Рис. 6.7. Выделение ЭВ ЕСНО 6 от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды, % от положительных проб, 2006-2017 гг.

Похожая картина наблюдается и в отношении ЭВ ЕСНО 30 (рис. 6.8). Два пика выделения этих вирусов от больных приходятся на 2007-2008 гг. и 2013 г., тогда же увеличивалось выделение ЭВ ЕСНО 30 из сточной воды. Коэффициент корреляции составил 0,61, что говорит о связи средней силы.

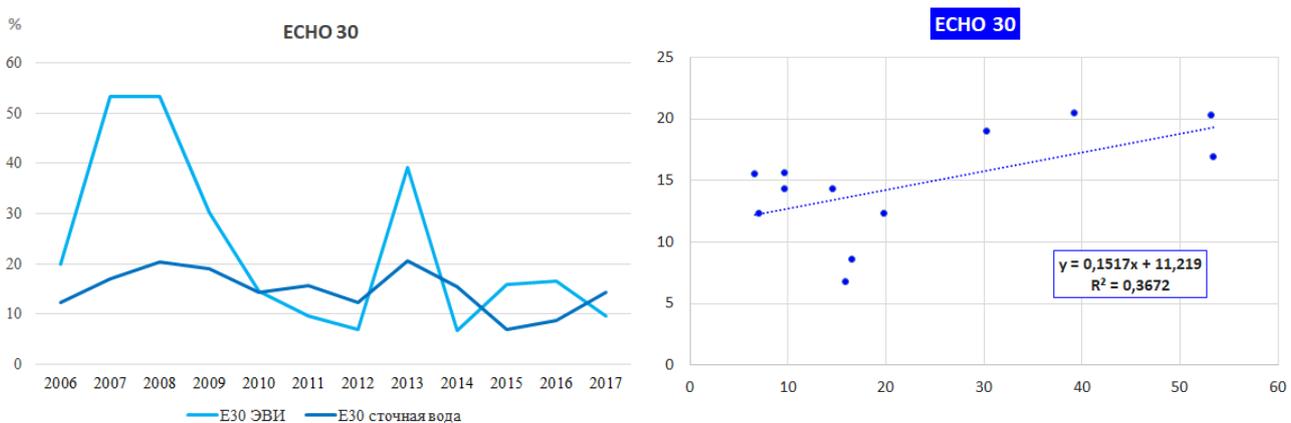


Рис. 6.8. Выделение ЭВ ЕСНО 30 от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды, % от положительных проб, 2006-2017 гг.

Коэффициент корреляции между выделением СВА от больных ЭВИ и из

проб сточной воды составил 0,73, что говорит о сильной прямой связи (рис. 6.9). До 2009 г. ЭВ CVA выделялись на наших территориях довольно редко. Это может быть связано с несколькими причинами. Во-первых, вирусы CVA не всегда размножаются в клеточных культурах. Пробы сточной воды обычно исследуются двумя методами: ПЦР и вирусологическим. С широким введением в практику молекулярно-генетических методов исследования вероятность детекции вирусов CVA у больных ЭВИ увеличилась, однако в концентрате сточной воды может содержаться большое количество примесей, мешающих проведению ПЦР. Поэтому пробы сточной воды, содержащие эти вирусы, исследователями могут расцениваться как ложноотрицательные. Во-вторых, CVA могут меньше сохраняться в сточной воде, чем другие энтеровирусы, либо хуже сорбироваться при сборе проб. В-третьих, ЭВ CVA вызывают в основном экзантемные формы заболевания, при которых происходит активное выделение вируса через содержимое везикул. Выделение вируса через кишечник может происходить в меньшей степени, чем при других формах энтеровирусной инфекции, вследствие чего ЭВ CVA могут содержаться в фекальном материале в более низкой концентрации, плохо поддаваясь детекции.

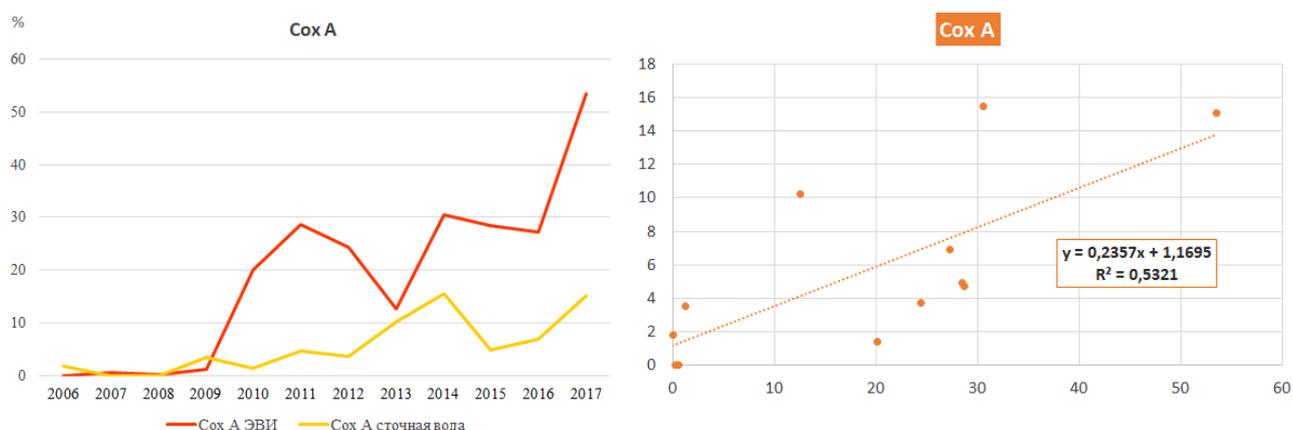


Рис. 6.9. Выделение ЭВ CVA от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды, % от положительных проб, 2006-2017 гг.

В отличие от рассмотренных ранее серотипов энтеровирусов, вирусы CVB выделялись из проб сточной воды в большем проценте случаев, чем от больных ЭВИ (рис. 6.10). Процент выделения CVB из проб воды не опускался ниже 25%, что говорит об их постоянной циркуляции на территориях СПб РЦ и о частом

бессимптомном носительстве этих вирусов. Коэффициент корреляции составил 0,49, что меньше, чем для рассмотренных выше энтеровирусов. Тем не менее в отдельные годы (2012 и 2014 гг.) видна чёткая взаимосвязь между выделением этих ЭВ от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды.

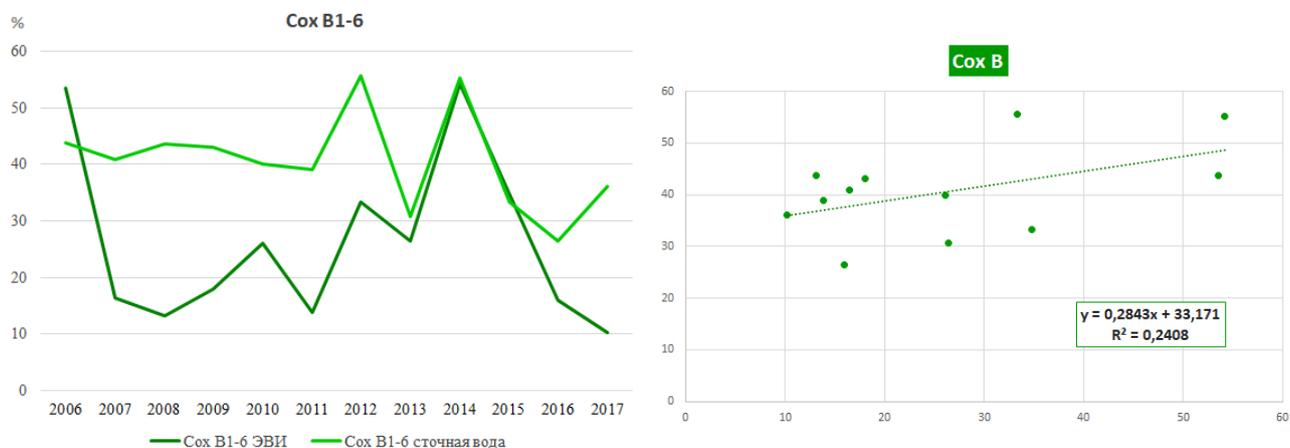


Рис. 6.10. Выделение ЭВ CVB от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды, % от положительных проб, 2006-2017 гг.

Таким образом, можно говорить о корреляции между выделением энтеровирусов одних и тех же серотипов от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды. Проб от больных ЭВИ ежегодно исследуется больше, чем проб сточной воды, поэтому из последних выделяется в целом меньше энтеровирусов. Кроме того, в среднем в каждой четвертой пробе сточной воды присутствуют полиовирусы (см. рис. 6.5), которые при росте в клеточной культуре размножаются быстрее, чем неполиомиелитные энтеровирусы.

В Программе ликвидации полиомиелита приоритетным является детекция полиовирусов в пробах сточной воды как индикатор их циркуляции среди населения. При обнаружении в пробе смеси ПВ+НПЭВ после разделения внимание исследователей фиксируется на полиовирусе: проводится его идентификация и внутритиповая дифференциация. Серотип неполиомиелитного энтеровируса, как правило, в таких случаях не определяется. Если присутствующий в смеси неполиомиелитный энтеровирус никак не проявляет себя в клеточной культуре, он остаётся незамеченным исследователями,

поскольку диагностическая ПЦР позволяет только констатировать наличие в пробе РНК энтеровируса, не определяя его серотип. Подобные неидентифицированные НПЭВ впоследствии не включаются в аналитические исследования.

Ежегодно на территориях СПб РЦ исследуется более тысячи проб сточной воды в рамках дополнительного надзора за полиовирусами. Спектр выделенных из проб сточной воды серотипов энтеровирусов отличается меньшим разнообразием по сравнению с энтеровирусами, выделенными от больных энтеровирусной инфекцией. Удалось установить корреляцию между выделением энтеровирусов различных серотипов от больных ЭВИ и из проб окружающей среды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Когда ВОЗ объявила Глобальную программу ликвидации полиомиелита, основной причиной острых вялых параличей энтеровирусной этиологии обычно являлись полиовирусы. После того, как циркуляция диких полиовирусов типов 2 и 3 была прервана во всём мире, а дикий полиовирус типа 1 элиминирован в большинстве регионов мира, их место частично начали занимать другие энтеровирусы. Статистика выделения НПЭВ у больных острыми вялыми параличами доступна не по всем странам и не за всё время. Согласно системному анализу, посвящённому выделению энтеровирусов у таких больных [179], лидирующими причинами ОВП из неполиомиелитных энтеровирусов являются энтеровирусы EV71, ЕСНО 11 и ЕСНО 6.

По результатам вирусологических исследований проб от больных с первичным диагнозом ОВП выделенные неполиомиелитные энтеровирусы практически в равной степени относились к различным серотипам вирусов CVA, CVB и ЕСНО. Энтеровирусы EV71 периодически выявляются у больных ЭВИ и в сточной воде (в период наблюдения из проб сточной воды данные вирусы не выделялись, однако их наличие в сточной воде было отмечено в другие годы мониторинга за ЭВИ) на территориях региона, официально зарегистрированных неврологических осложнений в период наблюдения они не вызывали. В 2008 г. в лаборатории СПб РЦ от трёхлетнего ребёнка был выделен EV71 [46]. Синдром острого вялого паралича начался у ребёнка во время поездки в Турцию, по возвращении в Санкт-Петербург он был госпитализирован. В результате секвенирования области генома VP1 и сравнения полученной нуклеотидной последовательности со штаммами других EV71 этот штамм относился к субгенотипу С2 и был родственен штаммам, циркулирующим в то время Европе.

Все идентифицированные энтеровирусы циркулируют на территориях СПб РЦ, за исключением ЭВ CVA21. ЭВ данного серотипа был выделен на территориях СПб РЦ только в 2014 г. от больного ОВП из Мурманской области и в 2013 г. от ребёнка, прибывшего из Казахстана.

Клинические симптомы энтеровирусной инфекции, в том числе параличи, развиваются далеко не у всех инфицированных энтеровирусом. У ребёнка в возрасте 1 год 9 мес. с ОВП, обследованного в лаборатории СПб РЦ, был выделен ЭВ CVB5 [44]. По контакту с больным было обследовано 8 контактных лиц - граждан Азербайджана, проживающих в одной квартире и не имевших признаки ЭВИ (один взрослый и 7 детей). У всех контактных также был выделен вирус CVB5.

Эпидемиологический надзор за энтеровирусной инфекцией является одним из важных видов дополнительного надзора, проводящегося в рамках Программы ликвидации полиомиелита. Показатели заболеваемости энтеровирусной инфекцией в рассматриваемый период значительно различались на отдельных территориях. Несмотря на повсеместную распространённость энтеровирусов, официальная статистика заболеваемости ЭВИ в разных регионах может отличаться вследствие неполной или наоборот избыточной диагностики. Наличие энтеровируса в образце фекалий не означает, что заболевание обусловлено именно им, так как существует бессимптомное носительство энтеровирусов. Для расшифровки этиологии ЭВИ обязательно проводят комплексные вирусологические и молекулярно-биологические исследования. Важно учитывать соответствие симптомов заболевания клинической картине именно энтеровирусной инфекции, а не ОРВИ или ОКИ. Прежде всего исследованию подлежат пробы фекалий, ликвора в случае энтеровирусного менингита и мазки с отделяемым везикул в случае экзантемных форм заболевания.

Во внутригодовой динамике заболеваемости ЭВИ в нашей стране прослеживается четко выраженная летне-осенняя сезонность с началом подъёма в июле и пиком в августе-сентябре, территории СПб РЦ не являются исключением. Основная часть заболеваний регистрировалась среди детей в возрасте до 17 лет из организованных коллективов или в летних лагерях отдыха. Многие вспышки ЭВИ происходили в период формирования детских коллективов, когда осуществлялась активная передача возбудителей восприимчивым лицам контактно-бытовым путем. Часто наблюдалось внутрисемейное распространение инфекции.

Преобладание клинических форм энтеровирусной инфекции не было одинаковым на разных территориях. На одних территориях СПб РЦ (г. Санкт-Петербург, Саратовская, Новгородская, Архангельская области) превалировал энтеровирусный менингит, на других (Вологодская, Мурманская, Ленинградская области, Республика Коми) чаще встречались экзантемные формы энтеровирусной инфекции: герпангина, ящуроподобный синдром, экзантема. Клиническая картина инфекции часто была связана с серотипом энтеровируса, циркулировавшим на территории: вирусы серотипов ЕСНО и CVB чаще становились причиной энтеровирусного менингита, тогда как вирусы CVA в большей степени вызывали экзантемные формы ЭВИ.

Лаборатория СПб РЦ осуществляет надзор за циркуляцией энтеровирусов с 2006 года. До рассматриваемого в работе периода в субъектах, курируемых СПб РЦ, также отмечались крупные вспышки ЭВИ (Нижегородская область, 2007 г., ЕСНО 30 [31]; Новгородская область, 2008 г., ЕСНО 6 и ЕСНО 30 [4]; Архангельская область, 2008 г., ЕСНО 30 [63]). Вирусы ЕСНО 30 из Архангельска генетически были близки к вирусам, выделенным от больных ЭВМ в Великом Новгороде в том же году и к одному из подтипов энтеровируса, вызвавшего периодический подъем заболеваемости ЭВМ в Нижнем Новгороде в 2007 г.

В отдельные годы заболеваемость ЭВИ была особенно высока. Подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией начался с 2013 года, когда из Юго-Восточной Азии, предположительно из Китая, был импортирован ЭВ **ЕСНО 30** генотипа h, вызвавший подъем заболеваемости серозным менингитом не только на территориях СПб РЦ, но и на многих других территориях России. Штаммы ЕСНО 30, выделяющиеся от больных ЭВМ из 32 субъектов РФ, в подавляющем большинстве относились к генотипу h [12, 52]. Предыдущий период высокой заболеваемости энтеровирусным менингитом в 2008-2009 годах был связан с ЕСНО 30 генотипа es2, имеющим мировое распространение [41, 193]. Филогенетический анализ циркулировавших в 2013 г. штаммов ЕСНО 30 показал, что этот вирус был занесен на территорию РФ в период 2009–2011 гг. и некоторое время циркулировал скрытно, пока не распространился достаточно широко,

чтобы это имело массовые последствия.

После импортирования на территорию Российской Федерации вирусы ЕСНО 30 генотипа h продолжили распространяться и изменяться независимо друг от друга. В последующие годы (2014-2016 гг.) они выделялись от больных энтеровирусным менингитом на разных территориях России и СПб РЦ.

В 2013 году также была отмечена циркуляция энтеровируса **EV71**: он выделялся от больных с экзантемными заболеваниями в четырёх областях, курируемых СПб РЦ. Это было связано с завозом в Российскую Федерацию из Китая патогенного генотипа С4а данного энтеровируса [12], который впоследствии распространился по регионам страны. Ни до, ни после 2013 г. данный вирус в таком количестве на территориях СПб РЦ не выявлялся.

С конца 2009 года на территориях СПб РЦ всё чаще начали встречаться ЭВ СVA, ранее выделявшиеся в единичных случаях. Первые случаи экзантемы полости рта и конечностей были зарегистрированы в Мурманской области в конце 2009 г. Этиологическим агентом заболеваний являлся вирус **СVA16**, вызывающий экзантему полости рта и конечностей. В англоязычной литературе это заболевание называют hand, foot and mouth disease (HFMD), его вспышки были зафиксированы во многих странах Юго-Восточной Азии (Китай, Вьетнам, Япония, Сингапур, Таиланд и др.) [120].

Вирусы другого серотипа - **СVA6** - включились в циркуляцию в 2014 году, обусловив заболеваемость экзантемными формами ЭВИ и герпангиной. В 2016 году они выделялись от больных в 34-х субъектах РФ [9]. В 2017 г. вирусы СVA различных серотипов стали самыми распространёнными в регионе этиологическими агентами заболеваний энтеровирусной инфекцией, в первую очередь СVA6, который выявлялся при групповых и спорадических случаях экзантемных форм ЭВИ в 64 из всех субъектов РФ [10]. Доминирование субгенотипов 6 и 8 в структуре СVA6, отмеченное на территориях СПб РЦ, наблюдалось в 2017 году и в целом по России.

Вирус **СVA6** долго не становился объектом внимания исследователей, т.к. вызванная им инфекция протекала обычно в лёгкой форме или бессимптомно.

Однако с 2008 г. после эпидемии HFMD в Финляндии [155] начали появляться сообщения о массовых вспышках этого заболевания, вызванных CVA6: в Азии с 2009 г., в США с 2011 г., в Китае с 2013 г. [75]. В азиатских странах широкая циркуляция ЭВ CVA6 отмечалась и ранее, однако этот вирус вызывал преимущественно герпангину. В Китае он вызывал HFMD в единичных случаях с 2008 года, а начиная с 2013 г. постепенно становится основным этиологическим агентом вспышек HFMD. Доля этих вирусов в этиологии HFMD в Юго-Восточной Азии начала снижаться, тогда как вирус CVA6, напротив, укрепил свои позиции. Экзантема полости рта и конечностей, причиной которой является вирус CVA6, в отличие от экзантемы, вызванной EV71 или CVA16, в последнее время характеризуется атипичными высыпаниями. Случаи инфекции регистрируются как среди детей, так и у взрослых. Вирус CVA6 плохо размножается в клеточной культуре, поэтому основным методом лабораторной диагностики в данном случае является ПЦР с последующим секвенированием генома ЭВ [75, 137, 155].

В 2017 г. на территории СПб РЦ (в Саратовской области) впервые этиологическим агентом сезонного подъема заболеваемости энтеровирусным менингитом явился энтеровирус **ЕСНО 18**. Филогенетический анализ выделенных штаммов показал, что имел место занос вируса с последующим распространением в популяции.

По данным научной литературы, энтеровирус ЕСНО 18 относительно редко становился причиной заболеваний. Имеется описание вспышки менингита и энцефалита в 2015 г. в провинции Hebei, Китай [84]. Штаммы ЕСНО 18, выделенные от больных во время той вспышки, оказались близки штаммам, выделенным во время вспышки ЭВМ в г. Саратов. Процент гомологии между саратовскими штаммами ЕСНО 18 и китайскими был достаточно высок.

Энтеровирусы **СVB** выделялись на всех территориях, курируемых СПб РЦ, в основном в спорадических случаях энтеровирусного менингита. ЭВ СVB также вызывали острые вялые параличи: при обследовании больных с ОВП доля этих энтеровирусов составила 27,8%. Помимо того, СVB выделялись из биологического материала от здоровых детей без симптомов ЭВИ и из проб

сточной воды, что говорит об их широкой циркуляции среди населения. Роль ЭВ CVB как возбудителей ЭВМ весьма значительна, несмотря на то, что они не являлись причиной крупных вспышек энтеровирусной инфекции. Штаммы ЭВ CVB, выделенные от больных энтеровирусной инфекцией и здоровых детей, отличались генетической разнородностью.

Ещё одной важной частью Программы ликвидации полиомиелита в Российской Федерации является надзор за циркуляцией полиовирусов среди детей из групп риска. К ним относятся дети до 5 лет из семей мигрантов, вынужденных переселенцев, кочующих групп населения, дети из домов ребёнка и других закрытых детских учреждений [64].

С 2006г. для прививок против полиомиелита в закрытых детских коллективах (домах ребёнка) должна использоваться только инактивированная вакцина. До прекращения вакцинации ОПВ возможность возникновения случаев вакциноассоциированного паралитического полиомиелита у детей в домах ребёнка была весьма высокой [30]. Применение ИПВ существенно снизило риск развития ВАПП в закрытых детских коллективах. С 2009 года вакцинация против полиомиелита всех детей в РФ начинается с ИПВ, что повлияло на заболеваемость ВАПП. Тем не менее, пока вакцинация детей в РФ в соответствии с Национальным календарем прививок продолжает проводиться с помощью ОПВ, существует риск заноса вакцинных полиовирусов в дома ребёнка с детьми, не прошедшими карантин при первичном поступлении или после возвращения из стационаров. Это было показано в нашем исследовании: от детей из дома ребёнка Новгородской области было выделено восемь вакцинных полиовирусов.

При обследовании здоровых детей из детских дошкольных учреждений одной северной территории у них было выделено большое количество НПЭВ (22%). Большой процент выделения НПЭВ в ДДУ объясняется временем сбора проб: материал собирался в сентябре, в момент формирования детских коллективов, когда дети возвращались с летнего отдыха на юге, где они могли инфицироваться энтеровирусами. В исследованиях других авторов по мониторингу выделения НПЭВ у здоровых детей также отмечено повышение

выделения ЭВ у здоровых носителей в осенне-летний период с пиком в октябре [53], что согласуется с летне-осенними подъёмами заболеваемости ЭВИ. Дети-носители энтеровирусов принимались в детские учреждения, поскольку не имели клинической симптоматики. Впоследствии имело место распространение энтеровирусов контактно-бытовым путём среди детей в группах.

Важно отметить, что все выделенные от здоровых детей из детских коллективов энтеровирусы являлись типичными для нашего региона, за исключением нескольких близкородственных штаммов CVA24, выделенных в доме ребёнка Санкт-Петербурга. Циркуляция этого ЭВ в детском учреждении, скорее всего, явилась следствием заноса этого энтеровируса воспитанником, прибывшим из одной из стран Средней Азии.

Особое внимание в рамках Программы ликвидации полиомиелита уделяется обследованию детей в возрасте до 5 лет, прибывших с родителями из неблагополучных территорий. В основном из стран СНГ, откуда в Россию идёт постоянный широкий поток трудовых мигрантов. Зачастую мигранты приезжают семьями с большим количеством детей, что облегчает передачу энтеровирусов в семье. Нередки случаи, когда у двух и более здоровых детей из одной семьи мигрантов выделялся энтеровирус одного серотипа.

Дополнительным фактором риска является то, что дети из семей мигрантов летом часто уезжают на родину, откуда завозят энтеровирусы, не циркулирующие в нашем регионе, что может представлять опасность для других детей в их окружении, например, в ДДУ. В исследовании показано выделение энтеровирусов вида С (CVA13, A17, A24, EV99) у детей из групп риска, прибывших из неблагополучных территорий. Энтеровирусы вида С на территориях СПб РЦ у детей-резидентов не выделялись.

Увеличение притока в Россию мигрантов из стран СНГ, где существуют благоприятные условия для циркуляции и трансмиссии как полиовирусов, так и НПЭВ, создает угрозу импортирования в Россию энтеровирусов, ранее не циркулировавших в стране, а также вирусов, представляющих собой штаммы рекомбинанты полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов [46].

Систематический вирусологический надзор за детьми из семей мигрантов позволяет быстро выявить и успешно контролировать ситуацию в случае импортирования «диких» полиовирусов на свободные от полиомиелита территории РФ.

Поскольку единственным резервуаром энтеровирусов является человек, во внешнюю среду эти вирусы попадают только с биологическим материалом от человека. Мониторинг сточных вод позволяет выявить скрытую циркуляцию энтеровирусов, которые обычно остаются вне поля зрения, т.к. не вызывают манифестных форм заболевания.

Спектр энтеровирусов, выделенных за длительный период наблюдения от больных ЭВИ и из объектов окружающей среды, оказался схожим. Разнообразие серотипов неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных из проб сточной воды, в целом уступало разнообразию серотипов, встречающихся у больных энтеровирусной инфекцией. Большой объём сточных вод, поступающих на очистные сооружения или в канализационный коллектор, может снизить чувствительность исследования вследствие фактора разбавления [33]. В пробах сточной воды чаще встречались ЭВ CVB, реже - ЭВ CVA. Энтеровирусы EV-71 выделены не были даже в те годы, когда этот вирус циркулировал на территориях региона. Вирусы ЕСНО 11 и 13 из проб сточной воды выделялись чаще, чем от больных ЭВИ. Это говорит о том, что инфицирование этими вирусами реже приводит к появлению клинической симптоматики, в отличие от вирусов ЕСНО 6 и 30. В основном они обуславливают бессимптомное носительство. В годы подъёмов заболеваемости ЭВИ из проб сточной воды на территориях часто выделялись энтеровирусы тех же серотипов, что и вирусы, вызвавшие подъём заболеваемости. Подобная корреляция была отмечена и в других исследованиях [107].

В 2002 году Российская Федерация в составе Европейского региона была сертифицирована Всемирной Организацией Здравоохранения как территория, свободная от циркуляции дикого полиовируса. Это было достигнуто благодаря Программе ликвидации полиомиелита, в которой наша страна принимает участие

с 1996 года. В постсертификационный период система эпидемиологического надзора за полиомиелитом на национальном и региональных уровнях направлена на совершенствование мероприятий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса страны. Необходимо продолжать работу по надзору за заболеваниями, протекающими с синдромом острого вялого паралича, лабораторное обследование больных ЭВИ, детей из групп риска, исследование проб из объектов окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энтеровирусная инфекция является серьезной проблемой здравоохранения, поскольку она ежегодно регистрируется во всех субъектах Российской Федерации и характеризуется высокой заболеваемостью в отдельные годы. Филогенетический анализ энтеровирусов, выделенных от больных энтеровирусной инфекцией на территориях региона, позволил выявить циркуляцию новых генотипов и генетических вариантов энтеровирусов разных типов. В 2013 году подъемы заболеваемости энтеровирусным менингитом на большинстве территорий были связаны с появлением нового генотипа h вируса ЕСНО 30, ранее не циркулировавшего в России, в том числе на территориях региона. В 2017 году подъемы заболеваемости экзантемными формами ЭВИ на многих территориях региона были обусловлены двумя субгенотипами (6 и 8) нового для России пандемического генотипа энтеровируса СVA6.

С помощью вирусологических и молекулярных методов исследования было показано, что дома ребёнка по-прежнему остаются учреждениями риска в связи с возможностью заноса и последующего распространения в них полиовирусов, которые могут вызывать заболевания острыми вялыми параличами и вакциноассоциированным паралитическим полиомиелитом. В домах ребёнка, а также у детей из детских коллективов была зафиксирована скрытая циркуляция как вакцинных полиовирусов, так и неполиомиелитных энтеровирусов. Филогенетический анализ расшифрованного участка генома VP1 выделенных вирусов показал, что штаммы одного типа, полученные от детей из одного и того же детского учреждения, были близкородственными и имели общее происхождение.

У здоровых детей из семей мигрантов, прибывших на территории СПб РЦ преимущественно из стран СНГ, были обнаружены не только постоянно циркулирующие в регионе энтеровирусы, но и вирусы, не встречающиеся на территориях региона. Выделенные энтеровирусы вида С (СVA 13, 17, 24 и EV99), к которому относятся и полиовирусы, представляют особую опасность из-за

возможности образования в процессе репликации в организме носителя рекомбинантов полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов вида С. Эти штаммы-рекомбинанты могут провоцировать возникновение вакциноассоциированного паралитического полиомиелита у детей.

Анализ неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, показал значительное разнообразие типов и генотипов энтеровирусов. Установлена корреляция между частотой выделения энтеровирусов некоторых широко распространенных типов (ЕСНО 6, ЕСНО 30, СVВ) из проб от больных энтеровирусной инфекцией и из проб сточной воды.

Энтеровирусы СVВ (В2, В3, В4 и В5) постоянно циркулировали на всех территориях региона в течение периода наблюдения, были выделены от всех категорий обследованных лиц (больных ОВП, ЭВИ и здоровых детей), а также из проб сточной воды.

Стратегический план ВОЗ по ликвидации полиомиелита предусматривает повышение эффективности вирусологического надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами и его продолжение как минимум до 2030 года. Согласно плану ВОЗ, с целью поддержания статуса стран, в том числе Российской Федерации как территории, свободной от полиомиелита, рекомендовано двукратное увеличение расчетного показателя выявления и вирусологического обследования больных ОВП с 1 до 2 случаев на 100 тысяч детей до 15 лет.

В целях успешной реализации Программы ликвидации полиомиелита рекомендовано усилить вирусологический надзор за здоровыми детьми из семей мигрантов, прибывающих из Таджикистана и Узбекистана, которые имеют границы со странами, где активно циркулируют дикие полиовирусы типа 1 и вакциннородственные полиовирусы типа 2. Необходимо активизировать вирусологическое исследование проб из окружающей среды, поскольку обнаружение в сточной воде диких и вакциннородственных полиовирусов будет свидетельствовать об импортировании этих вирусов на территорию Российской Федерации. Также существует необходимость более широко внедрять

молекулярные методы исследований, чтобы получить дополнительную информацию об энтеровирусах, циркулирующих на территориях, и зафиксировать импортное появление новых для территорий России типов и генотипов энтеровирусов.

ВЫВОДЫ

1. Расшифрована этиология сезонных подъёмов заболеваемости энтеровирусной инфекцией на 14 территориях России (ЕСНО 6 и ЕСНО 30 вызывали случаи энтеровирусного менингита; Coxsackievirus A6 и A16 обусловили подъёмы заболеваемости экзантемными формами инфекции). У больных с синдромом «острый вялый паралич» были обнаружены Coxsackievirus A, Coxsackievirus B и вирусы ЕСНО разных типов. Показана смена типов энтеровирусов, вызвавших периодические подъёмы заболеваемости в разные годы.
2. Филогенетический анализ энтеровирусов, выделенных от больных энтеровирусной инфекцией, позволил выявить циркуляцию новых генотипов и генетических вариантов энтеровирусов. В международную базу данных GenBank были депонированы нуклеотидные последовательности участка генома VP1 57 штаммов энтеровирусов.
3. Показаны различия в спектре неполиомиелитных энтеровирусов, обнаруженных у детей резидентов, и у здоровых детей из семей мигрантов. У детей из семей мигрантов были обнаружены энтеровирусы, ранее не циркулировавшие на территориях: Coxsackievirus A13, 17 и 24, относящиеся к виду С энтеровирусов, и энтеровирусы 75, 99, 120. От детей резидентов были выделены только характерные для курируемых территорий энтеровирусы.
4. Была выявлена корреляция между частотой выделения энтеровирусов из проб от больных энтеровирусной инфекцией и здоровых резидентов и частотой детекции этих вирусов в пробах сточной воды.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВАПП - вакциноассоциированный полиомиелит
ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
ДДУ - детские дошкольные учреждения
ИПВ – инактивированная полиомиелитная вакцина
НАО - Ненецкий автономный округ
НЛ - Национальная лаборатория
НПЭВ - неполиомиелитный энтеровирус
ОВП – острый вялый паралич
ОКИ - острая кишечная инфекция
ОПВ - оральная полиомиелитная вакцина (живая)
ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция
ПВ – полиовирус, полиовирусы
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РФ - Российская Федерация
СЗФО - Северо-Западный федеральный округ
СПб РЦ - Санкт-Петербургский Региональный центр
ЦПД - цитопатогенное действие
ЭВ – энтеровирус, энтеровирусы
ЭВИ - энтеровирусная инфекция
ЭВМ - энтеровирусный менингит
ЮВА - Юго-Восточная Азия
CVA – Coxsackievirus A
CVB - Coxsackievirus B
EV – энтеровирус
HFMD - hand, foot and mouth disease

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амяга Е.Н., Лукашев А.Н., Троценко О.Е., Корита П.В., Резник В.И. Идентификация и анализ новых и эпидемически значимых штаммов энтеровирусов с помощью молекулярно-биологического и филогенетического анализа // Здоровье населения и среда обитания. - 2012. - № 9. – С. 17-20.
2. Ахмадишина Л.В., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Троценко О.Е., Лукашев А.Н. Сероэпидемиология энтеровируса 71 типа на территории Хабаровского края // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 5. - С. 496.
3. Бессергенева И.К., Несговорова Г.Д., Слободенюк А.В., Слободенюк В.К. Тенденция эпидемического процесса неполиомиелитных энтеровирусных заболеваний в условиях мегаполиса // Здоровье населения и среда обитания. - 2010. - № 6. - С. 25-28.
4. Бичурина М.А., Пьяных В.А., Новикова Н.А., Леонова Н.П., Клевцова Г.А., Романенкова Н.И., Иванова Т.Г., Голицына Л.Н., Фомина Л.Б., Розаева Н.Р., Цейц О.Е., Луковникова Л.Б., Канаева О.И., Епифанова Н.В.. Сезонный подъем заболеваемости энтеровирусным менингитом в Новгородской области // Инфекция и иммунитет. - 2012. - Т.2, №4. – С. 747-752.
5. Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Голицына Л.Н. и др. Роль энтеровируса ЕСНО30 в этиологии энтеровирусной инфекции на Северо-западе России в 2013 году // Журнал Инфектологии. - 2014. – Т.6, № 3. - С. 84-91
6. Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Ермакова М.В., Камынина Л.С., Мадоян А.Г., Валдайцева Н.В., Леонова Н.П., Иванова Т.Г. Групповые заболевания энтеровирусной инфекцией, обусловленные вирусами Коксаки А16, на Северо-западе России // ЖМЭИ. - 2014. – № 2. - С. 51-58.
7. Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Розаева Н.Р. Экскреция вакцинных полиовирусов у детей – воспитанников учреждений закрытого типа // Журнал инфектологии. - 2010. - Т. 2, № 1. - С. 28-33.
8. Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Розаева Н.Р., Воротникова В.А. Глобальная ситуация по полиомиелиту. Стратегия и тактика ВОЗ по ликвидации полиомиелита // Журнал инфектологии. - 2011. - Том 3, № 2. – С. 5-14.
9. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Созонов Д.В., Новикова Н.А. Неполиомиелитные энтеровирусы в Российской Федерации в 2016 году // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». - 2017. - № 4.– С. 25-31.
10. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Созонов Д.В., Резайкин А.В., Сапега Е.Ю., Новикова Н.А. Неполиомиелитные энтеровирусы в Российской

- Федерации в 2017 году // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». – 2018. - № 5.– С. 5-12.
11. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Григорьева Г.И., Новикова Н.А. Вирус Коксаки А6 в Российской Федерации в 2014 году // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2015. - № 28. - С. 12-20.
12. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В., Новикова Н.А. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России // Медицинский альманах. - 2015. - № 5 (40). - С. 136-140.
13. Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Новикова Н.А. Молекулярно-генетические варианты вируса ЕСНО 9, идентифицированные у больных серозным менингитом в России в 2007–2009 гг. // Вопр. вирусологии. — 2011. — № 6. — С. 37–42.
14. Демина А.В., Нетесов С.В. Энтеровирусы. Часть 2. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений // Бюллетень СО РАМН. – 2009. - № 6. – С. 116-125.
15. Демина А.В., Терновой В.А., Карташов М.Ю., Локтев В.Б. Молекулярно-эпидемиологическое расследование вспышки серозных менингитов в Новосибирской области // Бюллетень сибирской медицины. - 2016. - Т. 15, № 2. - С. 20-27.
16. Жданов В.М., Гайдамович С.Я. Общая и частная вирусология. М.: Медицина, 1982. Т. II. 518 с.
17. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. 2е изд. СПб: ООО Издательство «Фолиант», 2006. 432 с.
18. Злобин В.И. Энтеровирусные инфекции// Инфекционные болезни. М.: Медицина, 1999. 654 с.
19. Иванова О.Е. Полиомиелит и стратегия вакцинации в Российской Федерации в постсертификационный период // ЖМЭИ. – 2011. - № 3. – С. 110-114.
20. Козлов В.Г. Поликлональные энтеровирусные диагностические сыворотки нового поколения // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. - №3. – С. 51-56.
21. Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рощина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., Хамитова И.В., Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И. Инфицированность трудовых мигрантов из Средней Азии и постоянных жителей Санкт-Петербурга возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним // Инфекция и иммунитет. - 2018. - Т. 8, № 1. - С. 61-70.
22. Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В., Мурина Е.А. Энтеровирусные инфекции. Пособие для врачей. СПб, 2012. 432 с.

23. Лукашев А.Н., Иванова О.Е., Худякова Л.В. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и ее роль в структуре инфекционной патологии в мире // ЖМЭИ. – 2010. - № 5. – С. 113-120.
24. Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Каравенская Т.Н., Перескокова М.А., Лебедева Л.А., Лашкевич В.А., Михайлов М.И. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 6 - возбудителя вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53, № 1. – С. 16-21.
25. Лукичѐва Л.А., Тареев С.Ю. Опыт работы специалистов территориального отдела Управления Роспотребнадзора и филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Мурманской области» по ликвидации территориальной вспышки энтеровирусной инфекции в Ковдорском районе Мурманской области // Материалы юбилейной Всероссийской научной конференции «Отечественная эпидемиология в 21 веке». СПб, 2012. С. 173-174.
26. Молекулярно-генетические исследования при мониторинге энтеровирусной инфекции. Методические рекомендации 4.4.0136-18, 2018.
27. Морозова Н.С., Михайлова Ю.М. Анализ заболеваемости энтеровирусной (неполио) инфекцией в Российской Федерации в сезон 2016 г. // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». – 2017. - № 4. – С. 3-5.
28. Мурина Е.А., Аксенов О.А., Скрипченко Н.В., Пульман Н.Ф. Мониторинг энтеровирусов в Северо-Западном регионе России // Детские инфекции. 2006. - Т. 5, № 1. - С. 11-16.
29. Оленькова О.М., Ковтун О.П., Бейкин Я.Б., Лагерева Ю.Г., Сбитнева Н.Н., Павленко Т.П. Энтеровирусные менингиты у детей: оценка эпидемиологической значимости, особенности диагностики и клинического течения // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2014. - №1. – С. 18-22.
30. Онищенко Г.Г., Дроздов С.Г., Лялина Л.В., Бичурина М.А., Грачев В.П., Иванова О.Е., Ясинский А.А., Романенкова Н.И., Жебрун А.Б., Чернявская О.П., Воронцова Т.В., Розаева Н.Р. Проблемы ликвидации полиомиелита. Монография. СПб, 2008. 304 с.
31. Онищенко Г.Г., Новикова Н.А., Ефимов Е.И., Княгина О.Н., Петров Е.Ю., Новиков Д.В., Голицына А.Н., Калашникова Н.А., Епифанова Н.В., Погодина Л.В. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Нижнем Новгороде в 2007 г.: молекулярно-эпидемиологические аспекты // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 2. — С. 24–30.
32. Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП). Методические указания 4.2.2410—08, 2008.

33. Организация и проведение вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы. Методические указания МУК 4.2.2357-08, 2008.
34. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности. Методические указания 1.3.2569-09, 2009.
35. Перескокова М.А., Резник В.И., Лебедева Л.А., Савосина Л.В., Исаева Н.В. Роль санитарно-вирусологических исследований сточных вод для оценки эпидситуации по энтеровирусным инфекциям // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. – 2008. - № 12. – С. 15-26.
36. Попов А.Ф., Колпаков С.Л., Миргородская Н.В., Приходченко Т.О., Пузикова С.Ю. Энтеровирусная инфекция в Приморском крае в современный период: клинко-эпидемиологическая характеристика // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. - № 1. – С. 23-27.
37. Протасеня И.И., Молочный В.П., Константинов С.В. Асептические менингиты энтеровирусной этиологии у детей // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2012. - № 21. - С. 26-30.
38. Профилактика полиомиелита. Санитарные правила СП 3.1.2951-11, 2011.
39. Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Устюжанин А.В., Шарабрин С.В., Алимов А.В. Мониторинг циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов среди населения г. Екатеринбурга // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». – 2017, - № 4. – С. 19-23.
40. Романенкова Н.И., Бичурина М.А. Энтеровирусы // Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. Т. II. 928 с.
41. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И. Неполиомиелитные энтеровирусы, циркулирующие на ряде территорий Российской Федерации в 2016 году // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». – 2017. - № 4.– С. 14-18.
42. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И. Риск заноса и распространения полиовирусов в детских учреждениях закрытого типа // ЖМЭИ. - 2014. – № 6. - С. 90-95.
43. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция на ряде территорий Российской Федерации в 2017 году // Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции». – 2018. - № 5. – С. 23-26.

44. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Шишко Л.А., Черкасская И.В., Кириллова Л.П. Вирусы Коксаки В1-6 как этиологический фактор энтеровирусной инфекции // Журнал инфектологии. – 2016. – Т 8, №2. – С. 65-71.
45. Романенкова Н.И., Голицына Л.Н., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Зверев В.В., Созонов Д.В., Черкасская И.В., Кириллова Л.П., Ермакова М.В., Камынина Л.С., Петухова М.Б., Грицай А.Б., Новикова Н.А. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией и особенности циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов на некоторых территориях России в 2017 году // Журнал Инфектологии. – 2018. – Т.10, №4. – С. 124-133.
46. Романенкова Н.И., Канаева О.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р. Детекция неполиомиелитных энтеровирусов у больных острыми вялыми параличами, детей из организованных коллективов и детей из семей мигрантов // Журнал Инфектологии. - 2014. – Т.6, № 4. - С.43-48.
47. Романенкова Н.И., Розаева Н.Р., Бичурина М.А., Канаева О.И., Чхинджерия И.Г. Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит и острые вялые параличи на ряде территорий России за двадцатилетний период // Журнал Инфектологии. – 2019. – Т.11, №3. – С. 102-109.
48. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. ВОЗ, Женева, 2005. 4е изд. 112 с.
49. Рюкерт Р.Р. Пикорнавирусы и их репликация // Вирусология, пер. с англ., под ред. Филдса Б. и др. М.: Мир, 1999. Т. 2. С. 190-256.
50. Самойлович Е.О., Ухова И.Ф., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Семейко Г.В. Коциркуляция кишечных вирусов в закрытом детском коллективе после вакцинации живой оральной полиовакциной // Медицинский журнал. - 2010. - № 1 (31). - С. 76-79.
51. Сапега Е.Ю., Бутакова Л.В., Котова В.О., Амяга Е.Н., Троценко О.Е. Молекулярно-биологические особенности циркуляции энтеровирусов в Дальневосточном федеральном округе Российской Федерации в 2014-2015 годах // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2016. - № 30. - С. 38-44.
52. Сапега Е.Ю., Бутакова Л.В., Котова В.О., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Курганова О.П., Игнатьева М.Е., Гарбуз Ю.А., Дарижапов Б.Б., Янович В.А. Молекулярно-генетическое разнообразие и филогенетический анализ штаммов энтеровирусов, циркулирующих на территории Дальневосточного федерального округа Российской Федерации // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. – 2015. - №28. - С. 26-33.
53. Сергеев А.Г., Устюжанин А.В., Резайкин А.В., Алимов А.В. Оценка эпидемиологической опасности штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих среди населения, по результатам молекулярно-генетического мониторинга // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. - № 28. – С. 20-26.

54. Симованьян Э.Н., Денисенко В.Б., Бовтало Л.Ф., Белугина Л.В., Ким М.А., Кухоль Ю.С. Клинико-лабораторная характеристика инфекции, вызванной энтеровирусом-71 // *Детские инфекции*. - 2014. - Т. 13, № 3. - С. 12-19.
55. Снитковская Т.Э., Скрябина С.В. Характеристика энтеровирусных инфекций в Свердловской области // *Гигиена и эпидемиология*. – 2008. - № 8. – С. 146-149.
56. Тарасенко Т., Косенок Е.В., Каленик А.В., Дзюба Г.Т. О вспышке энтеровирусной инфекции во Владивостоке // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. – 2009. - № 3. – С. 81-82.
57. Тимошенко В.С., Полушин О.Г. Клинико-морфологические проявления энтеровирусной Коксаки-инфекции у взрослых // *Pacific Medical Journal*, 2003, no. 2, pp. 61-63.
58. Троценко О.Е., Корита Т.В., Сапега Е.Ю., Бондаренко А.П., Курганова О.П., Отт В.А., Зайцева Т.А. Современные представления об эпидемиологии острых кишечных инфекций, передающихся водным путём // *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. - 2015. - № 26. - С. 58-67.
59. Троценко О.Е., Курганова О.П., Зайцева Т.А. и др. Использование научного потенциала в международном сотрудничестве России и Китая по вопросам противодействия эпидемическому распространению энтеровирусных инфекций // *Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии*. – 2015. - №28. – С. 6-12.
60. Устюжанин А.В., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Новые подходы в оценке эпидемической значимости штаммов неполиомиелитных энтеровирусов по данным молекулярно-генетического мониторинга их циркуляции на территории мегаполиса // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями»*. Нижний Новгород, 2016. – С. 106-111.
61. Харченко Г.А., Кимирилова О.Г. Энтеровирусные нейроинфекции у детей // *Астраханский медицинский журнал*. - 2011. - Т. 6, № 2. - С. 197-201.
62. Шевцова Н.П., Голубева М.В. Неврологические проявления энтеровирусной инфекции // *Детские инфекции*. - 2004. - № 3. - С. 49-52.
63. Шишко Л.А., Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Гордиенко Т.А., Розаева Н.Р., Голицына Л.Н., Фомина Н.Б., Канаева О.И., Лялина Л.В., Новикова Н.А.; Этиология сезонных подъёмов заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Архангельской области // *Инфекция и иммунитет*. - 2013. – Т. 3, № 1. - С. 65-72.
64. Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и острыми вялыми параличами в постсертификационный период. МУ 3.1.1. 2360—08, 2008.
65. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции. Методические указания 3.1.1.2363-08, 2008.

66. Яговкин Э.А., Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Соловьев М.Ю., Ковалев Е.В., Твердохлебова Т.И., Хмелевская Г.В., Девтерова Л.В., Вачаев Б.Ф., Юрьева И.Л. Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2016. - № 4 (89). - С. 74-82.
67. Agol V.I. Vaccine-derived polioviruses. *Biologicals*, 2006, vol. 34, no. 2, pp. 103-108.
68. Al-Hello H., Paananen A., Eskelinen M., Ylipaasto P., Hovi T., Salmela K., Lukashev A.N., Bobegamage S., Roivainen M. An enterovirus strain isolated from diabetic child belongs to a genetic subcluster of echovirus 11, but is also neutralised with monotypic antisera to coxsackievirus A9. *J. Gen. Virol.*, 2008, vol. 89, no. 8, pp. 1949–1959.
69. Arnold J.J., Cameron C.E. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) is sufficient for template switching in vitro. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 5, pp. 2706-2716.
70. Aylward B., Tangermann R. The global polio eradication initiative: Lessons learned and prospects for success. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 4, pp. 80-85.
71. Bailly J.L., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonne F., Traore O., Peigue-Lafeuille H. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 699–708.
72. Barnabei M.S., Sjaastad F.V., Townsend D., Bedada F.B., Metzger J.M. Severe dystrophic cardiomyopathy caused by the enteroviral protease 2A-mediated C-terminal dystrophin cleavage fragment. *Science Translational Medicine* 2015; vol. 7, no. 294, pp. 294 ra106.
73. Belov G.A., Nair V., Hansen B.T., Hoyt F.H., Fischer E.R., Ehrenfeld E. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol.*, 2012, vol. 86, no. 1, pp. 302–312.
74. Bessaud M., Jegouic S., Joffret M.-L., Barge C., Balanant J., Gouandjika-Vasilache I., Delpeyroux F. Characterization of the genome of human enteroviruses: Design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *Journal of Virological Methods*, 2008, vol. 149, no. 2, pp. 277–284.
75. Bian L., Wang Y., Yao X., Mao Q., Xu M., Liang Z. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 2015, vol. 13, no. 9, pp. 1061-71.
76. Bible J.M., Iturriza-Gomara M., Megson B., Brown D., Pantelidis P., Earl P., Bendig J., Tong C.Y. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 10, pp. 3192-200.

77. Blomqvist S., El Bassioni L., El Maamoon Nasr E.M., Paananen A., Kaijalainen S., Asghar H., et al. Detection of imported wild polioviruses and of vaccine-derived polioviruses by environmental surveillance in Egypt. *Appl Environ Microbiol.*, 2012, vol.78, no. 15, pp. 5406-9.
78. Brown B., Oberste M.S., Maher K., Pallansch M.A. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol.*, 2003, vol. 77, no. 16, pp. 8973-84.
79. Brown B.A., Maher K., Flemister M.R., Naraghi-Arani P., Uddin M., Oberste M.S., Pallansch M.A. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J. Gen. Virol.*, 2009, vol. 90, no. 7, pp. 1713-1723.
80. Brown B.A., Oberste S., Alexander J.P., Kennett M.L., Pallansch M.A. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *Journal of Virology*, 1999, vol. 73, no. 12, pp. 9969-9975.
81. Carter J., Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, 2007, pp. 157-172.
82. Casas I., Palacios G.F., Trallero G., Cisterna D., Freire M.C., Tenorio A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J. Med. Virol.*, 2001, vol. 65, pp. 138–148.
83. Chehadeh W., Kerr-Conte J., Pattou F., Alm G., Lefebvre J., Wattré P., Hober D. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *Journal of Virology*, 2000, vol. 74, no. 21, pp. 10153–10164.
84. Chen X., Li J., Guo J., Xu W., Sun S., Xie Z. An outbreak of echovirus 18 encephalitis/meningitis in children in Hebei Province, China, 2015. *Emerg Microbes Infect.*, 2017, vol. 6, no. 6, pp. e54.
85. Chevaliez S., Szendrői A., Caro V., Balanant J., Guillot S., Berencsi G., Delpeyroux, F. Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination. *Virology*, 2004, vol. 325, no.1, pp. 56–70.
86. Clark M.E., Lieberman P.M., Berk A.J., Dasgupta A.S. Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, vol. 13, no. 2, pp. 1232–1237.
87. *Classification and nomenclature of viruses*, vol. 2. Ed. Wildy P. S. Karger, Basel, Switzerland, 1971.
88. Dalldorf G., Sickles G.M. A virus recovered from the feces of poliomyelitis patients pathogenic for suckling mice. *J. Exp. Med.*, 1949, vol. 89, no. 6, pp. 567–582.

89. Dominguez S.R., Briese T., Palacios G., Hui J., Villari J., Kapoor V., Tokarz R., Glode M.P., Anderson M.S., Robinson C.C., Holmes K.V., Lipkin W.I. Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade. *J. Clin. Virol.*, 2008, vol. 43, no.2, pp. 219–222
90. Elfving M., Svensson J., Oikarinen S., Jonsson B., Olofsson P., Sundkvist G., Lindberg B., Lernmark A., Hyoty H., Ivarsson S.-A. Maternal enterovirus infection during pregnancy as a risk factor in offspring diagnosed with type 1 diabetes between 15 and 30 years of age. *Exp. Diabetes Res.*, 2008, vol. 2008, 6 p.
91. Eshaghi A., Duvvuri V.R., Isabel S., Banh P., Li A., Peci A., Patel S.N., Gubbay J.B. Global Distribution and Evolutionary History of Enterovirus D68, with Emphasis on the 2014 Outbreak in Ontario, Canada. *Front Microbiol.*, 2017, vol.8, pp. 257.
92. Esposito S., Bosis S., Niesters H., Principi N. Enterovirus D68 Infection. *Viruses*, 2015, vol. 7, no. 11, pp. 6043–6050.
93. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid Risk Assessment—Enterovirus detections associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries, 8 August 2016. Stockholm: ECDC.
94. Euscher E., Davis J., Holzman I., Nuovo G.J. Coxsackie virus infection of the placenta associated with neurodevelopmental delays in the newborn. *Obstet. Gynecol.*, 2001, vol. 98, no. 6, pp. 1019–1026.
95. Evans D.J., Almond J.W. Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 1998, vol. 6, pp. 198–202.
96. Faleye T.O.C., Adeniji J.A. Enterovirus Species B Bias of RD Cell Line and Its Influence on Enterovirus Diversity Landscape. *Food Environ. Virol.*, 2015, vol. 7, pp. 390–402.
97. Faleye T.O.C., Adewumi M.O., Adeniji, J.A. Defining the Enterovirus Diversity Landscape of a Fecal Sample: A Methodological Challenge? *Viruses* 2016, vol.8, no. 18, 11 p.
98. Gmyl A.P., Belousov E.V., Maslova S.V., Khitrina E.V., Chetverin A.B., Agol V.I. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, no. 11, pp. 8958–8965.
99. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Geneva, Switzerland, WHO, 2003.
100. Harvala H., Broberg E., Benschop K., Berginc N., Ladhani S., Susi P. et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of clinical virology*, 2018, vol. 101, pp. 11-17.

101. Ho M., Chen E.R., Hsu K.H., Twu S.J., Chen K.T., Tsai S.F., Wang J.R., Shih S.R. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N. Engl. J. Med.*, 1999, vol. 341, no. 13, pp. 929-935.
102. Hober D., Sane F. Enteroviruses and type 1 diabetes. *BMJ*, 2011, vol. 342, pp. 391.
103. Hogle J.M., Chow M., Filman D.J. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 1985, vol. 229, pp. 1358–1365.
104. Holm-Hansen C.C., Midgley S.E., Schjørring S., Fischer T.K. The importance of Enterovirus surveillance in a Post-polio world. *Clin Microbiol Infect.*, 2017, vol. 23, no. 6, pp. 352-354. <https://www.picornaviridae.com/sg3/enterovirus/enterovirus.htm> [accessed on Feb 2021].
105. Hyypiä T., Hovi T., Knowles N.J., Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol.*, 1997, vol. 78, no. 1, pp. 1-11.
106. Irani D.N. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol. Clin.*, 2008, vol. 26, no. 3, pp. 635–655.
107. Ivanova O.E., Yarmolskaya M.S., Eremeeva T.P., Babkina G.M., Baykova O.Y., Akhmadishina L.V., Lukashev A.N. Environmental Surveillance for Poliovirus and Other Enteroviruses: Long-Term Experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 5, pp. 424.
108. Jacobson L.M., Redd J.T., Schneider E., Lu X., Chern S.W., Oberste M.S., Erdman D.D., Fischer G.E., Armstrong G.L., Kodani M., Montoya J., Magri J.M., Cheek J.E. Outbreak of lower respiratory tract illness associated with human enterovirus 68 among American Indian children. *Pediatr. Infect. Dis.*, 2012, vol. 31, no. 3, pp. 309–312.
109. Jacques J., Moret H., Minette D., Leveque N., Jovenin N., Deslee G., Lebargy F., Motte J., Andreoletti L. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no.1, pp. 206–213.
110. Jaïdane H., Sauter P., Sane F., Goffard A., Gharbi J., Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev Med Virol*, 2010, vol. 20, pp. 1-16.
111. Jartti T., Lehtinen P., Vuorinen T., Osterback R., van den Hoogen B., Osterhaus A.D., Ruuskanen O. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg.Infect.Dis.*, 2004, vol. 10, no. 6, pp. 1095–1101.
112. Joachims M., Van Breugel P.C., Lloyd R.E. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, no. 1, pp. 718–727.
113. Joffret M.-L., Je´ gouic S., Bessaud M., Balanant J., Tran C., Caro V., Holmblat B., Razafindratsimandresy R., Reynes J.-M., Rakoto-Andrianarivelo M., Delpeyroux F. Common and Diverse Features of Cocirculating Type 2 and 3 Recombinant Vaccine-Derived Polioviruses Isolated From Patients With Poliomyelitis and Healthy Children. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 205, no. 9, pp. 1363–73.

114. Karrasch M., Fischer E., Scholten M., Sauerbrei A. et al. A severe pediatric infection with a novel enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. *Journal of Clinical Virology*, 2016, vol. 84, pp. 90-95.
115. Ke G.M., Lin K.H., Lu P.L., Tung Y.C., Wang C.F., Ke L.Y. et al. Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Taiwan, 1988–2008. *Virus genes*, 2011, vol. 42, no. 2, pp. 178-188.
116. Kemball C.C., Alirezaei M., Whitton J.L. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. *Future Microbiol.*, 2010, vol. 5, no. 9, pp. 1329–1347.
117. Khan F. Enterovirus D68: Acute respiratory illness and the 2014 outbreak. *Emerg. Med. Clin. North Am.*, 2015, vol. 33, no. 2, e19–e32.
118. Khanh T.H., Sabanathan S., Thanh T.T., Thoa le P.K., Thuong T.C., Hang V.T., Farrar J., Hien T.T., Chau N., van Doorn H.R. Enterovirus 71-associated Hand, Foot, and Mouth Disease, Southern Vietnam, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 12, pp. 2002-2005.
119. Kilpatrick D.R., Nottay B., Yang C.F., Yang S.J., Mulders M.N., Holloway B.P., Pallansch M.A., Kew O.M. Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol.*, 1996, vol. 34, pp. 2990 – 2996.
120. Koh W.M., Bogich T., Siegel K., Jin J., Chong E.Y., Tan C.Y., Chen M.I., Horby P., Cook A.R. The Epidemiology of Hand, Foot and Mouth Disease in Asia: A Systematic Review and Analysis. *Pediatr Infect Dis J.*, 2016, vol. 35, no. 10, pp. e285–e300.
121. Kuyumcu-Martinez, N.M.; van Eden, M.E.; Younan, P.; Lloyd, R.E. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: A novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell Biol.*, 2004, vol. 24, pp. 1779–1790.
122. Kyriakopoulou Z., Amoutzias G.D., Dimitriou T.G., Tsakogiannis D., Mossialos D., Markoulatos P. Intra- and inter-serotypic recombinations in the 5' UTR-VP4 region of Echovirus 30 strains. *Archives of virology*, 2018, vol. 163, no. 2, pp. 365-375.
123. Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Amoutzias G.D., Markoulatos P. Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus Genes*, 2015, vol. 50, no. 2, pp. 177-188.
124. Laboratory support for activities aimed at the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Plan of action WHO. Geneva WHO, 1995, 15 p.
125. Laitinen O.H., Svedin E., Kapell S., Nurminen A., Hytönen V.P., Flodström-Tullberg M. Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity. *Rev Med Virol.*, 2016, vol. 26, no. 4, pp. 251-267.
126. Lamphear B.J., Yan R.I., Yang F., Waters D., Liebig H.D., Klump H., Kuechler E., Skern T., Rhoads R.E. Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A

proteases from human coxsackievirus and rhinovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no. 26, pp. 19200–19203.

127. Landsteiner K., Popper E. Mikroskopische präparate von einem menschlichen und zwei affentückermarker. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1908, vol. 21, pp. 1830.

128. Lee B.E., Davies H.D. Aseptic meningitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2007, vol. 20, no. 3, pp. 272–277.

129. Lee M.-S., Tseng F.-C., Wang J.-R., Chi C.-Y., Chong P., Su I.-J. Challenges to Licensure of Enterovirus 71 Vaccines. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2012, vol. 6, no. 8, e1737.

130. Lei X., Xiao X., Wang J. Innate Immunity Evasion by Enteroviruses: Insights into Virus-Host Interaction. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 22.

131. Lei X., Xiao X., Xue Q., Jin Q., He B., Wang J. Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses. *Journal of Virology*, 2013, vol. 87, no. 3, pp. 1690–1698.

132. Lei X.; Han N.; Xiao X.; Jin Q.; He B.; Wang J. Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 17, pp. 9830–9841.

133. Leland D.S., Ginocchio C.C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology // *Clinical microbiology reviews*, 2007, vol. 20, no. 1, pp. 49–78.

134. Li L., He Y., Yang H., Zhu J., Xu X., Dong J., Zhu Y., Jin Q. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. *J Clin Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 3835-39.

135. Li R., Liu L., Mo Z., Wang X., Xia J., Liang Z., Zhang Y., Li Y., Mao Q., Wang J. et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *N. Engl. J. Med.*, 2014, vol. 370, no. 9, pp. 829–837.

136. Lin T.Y., Chang L.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Chiu C.H., Hsueh C., Shih S.R., Liu C.C., Wu M.H. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin Infect Dis*, 2002, vol. 34(Suppl 2), pp. S52–S57.

137. Liu W., Wu S., Xiong Y., Li T., Wen Z., Yan M., Qin K., Liu Y., Wu J. Co-circulation and genomic recombination of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 during a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in Central China. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. e96051.

138. Lowry K., Woodman A., Cook J., Evans D.J. Recombination in enteroviruses is a biphasic replicative process involving the generation of greater-than genome length “imprecise” intermediates. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 6, pp. e1004191.

139. Lukashev A.N. Role of recombination in evolution of Enteroviruses. *Rev. Med. Virol.*, 2005, vol. 15, pp. 157–167.

140. Lv S., Rong J., Ren S., Wu M., Li M., Zhu Y., Zhang J. Epidemiology and diagnosis of viral myocarditis. *Hellenic J. Cardiol.*, 2013, vol. 54, no. 5, pp. 382-391.
141. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 6th edn. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, 2005, 3661 p.
142. Marjomäki V., Turkki P., Huttunen M. Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. *Viruses*, 2015, vol. 7, no. 12, pp. 6387-99.
143. Melnick J.L., Agren K. Poliomyelitis and Coxsackievirus isolated from Normal infants in Egypt. *J. Exp. Biol. Med.* 1952, vol. 81, no. 3, pp. 621–624.
144. Melnick J.L., Rennick V., Hampil B., Schmidt N.J., Ho H.H. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1973, vol. 48, no. 3, pp. 263.
145. Melnick J.L., Tagaya I., von Magnus H. Enteroviruses 69, 70, and 71. *Intervirolgy*, 1974, vol. 4, pp. 369–370.
146. Mendelsohn C.L., Wimmer E., Racaniello V.R. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 1989, vol. 56, no. 5, pp. 855-865.
147. Midgley S.E., Benschop K., Dyrdak R., Mirand A., Bailly J.L. et al. Co-circulation of multiple enterovirus D68 subclades, including a novel B3 cluster, across Europe in a season of expected low prevalence, 2019/20. *Euro Surveill.*, 2020, vol. 25, no. 2, pp. 1-12.
148. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Ughetto S., Antona D., Bailly J.L., Peigue-Lafeuille H. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. E110-8.
149. Moran-Gilad J., Kaliner E., Gdalevich M., Grotto I. Public health response to the silent reintroduction of wild poliovirus to Israel, 2013-2014. *Clin Microbiol Infect.*, 2016, vol. 22, pp. 140-145.
150. Muir P., Kämmerer U., Korn K., Mulders M.N., Pöyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M., van Loon A.M. Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements. *Clin. Microb. Rev.*, 1998, vol. 11, no. 1, pp. 202–227.
151. Mukherjee A., Morosky S.A., Delorme-Axford E., Dybdahl-Sissoko N., Oberste M.S., Wang T., Coyne C.B. The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathogens*, 2011, vol. 7, no. 3, pp. e1001311.
152. Muslin C., Joffret M.L., Pelletier I., Blondel B., Delpeyroux F. Evolution and emergence of enteroviruses through intra-and inter-species recombination: Plasticity and phenotypic impact of

- modular genetic exchanges in the 5' untranslated region. *PLoS Pathog*, 2015, vol. 11, no. 11, pp. e1005266.
153. Nikolaidis M., Mimouli K., Kyriakopoulou Z., Tsimpidis M., Tsakogiannis D., Markoulatos P., Amoutzias G. D. Large-scale genomic analysis reveals recurrent patterns of intertypic recombination in human enteroviruses. *Virology*, 2019, vol. 526, pp. 72-80.
154. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 8, pp. 2698–2704.
155. O'sterback R., Vuorinen T., Linna M., Susi P., Hyypia" T., Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease. Finland. *Emerg Infect Dis*, 2009, vol. 15, no. 9, pp. 1485–1488.
156. Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Brown B.A. Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, no. 5, pp. 1288–1293.
157. Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.*, 1999, vol.73, no. 3, pp. 1941–1948.
158. Oberste M.S., Nix W.A., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Pallansch M.A. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus research*, 2003, vol. 91, no. 2, pp. 241-248.
159. Ooi M.H., Wong S.C., Lewthwaite P., Cardoso M.J., Solomon T. Clinical features, diagnosis and management of human enterovirus 71 infection. *Lancet Neurol.*, 2010, vol. 9, no.11, pp. 1097–1105.
160. Ooi M.H., Wong S.C., Podin Y., Akin W., del Sel S., Mohan A., Chieng C.H., Perera D., Clear D., Wong D., Blake E., Cardoso J., Solomon T. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. *Clin Infect Dis*, 2007, vol. 44, no. 5, pp. 646–656.
161. Pallansch M., Roos R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: *Fields Virology*, 5th Edition. Ed. Knipe D.M., Howley P.M., Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 839-895.
162. Paul D., Bartenschlager R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J. Virol.*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 32–48.
163. Racaniello V.R. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*, 5th Edition. Ed. Knipe D.M., Howley P.M., Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 795-839.
164. Ray C.G. Enteroviruses. In: *Sherris Medical Microbiology*, 4th Edition. Ed. Ryan K.J., Ray C.G., The McGraw-Hill Companies, 2004, pp. 531-541.

165. Regamey N., Kaiser L., Roiha H.L., Deffernez C., Kuehni C.E., Latzin P., Aebi C., Frey U. Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *Pediatr. Infect. Dis.*, 2008, vol. 27, no.2, pp. 100–105.
166. Rhoades R.E., Tabor-Godwin J.M., Tsung G., Feuer R. Enterovirus Infections of the Central Nervous System Review. *Virology*, 2011, vol. 411, no. 2, pp. 288–305.
167. Rossmann M.G., He Y., Kuhn R.J. Picornavirus–receptor interactions. *Trends in Microbiology*, 2002, vol. 10, pp. 324–331.
168. Runckel C., Westesson O., Andino R., DeRisi J.L. Identification and Manipulation of the Molecular Determinants Influencing Poliovirus Recombination. *PLoS pathogens*, 2013, vol. 9, no. 2, C. e1003164.
169. Ryu W.S., Kang B., Hong J., Hwang S., Kim A., Kim J., Cheon D.S. Enterovirus 71 infection with central nervous system involvement, South Korea. *Emerg Infect Dis*, 2010, vol. 16, no. 11, pp. 1764–1766.
170. Sabin A.B. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *Journal of infectious diseases*, 1985, vol. 151, no. 3, pp. 420-436.
171. Sadeuh-Mba S.A., Bessaud M., Massenet D., Joffret M.L., Endegue M.C., Njouom R., Reynes J.M., Rousset D., Delpeyroux F. High Frequency and Diversity of Species C Enteroviruses in Cameroon and Neighboring Countries. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no.3, pp. 759-770.
172. Salk J.E. Recent studies in immunization against poliomyelitis. *Pediatrics*, 1953, vol. 12, pp. 471-482.
173. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467.
174. Schlapbach L.J., Ersch J., Balmer C., Prêtre R., Tomaske M., Caduff R., Morwood J., Provenzano S., Stocker C. Enteroviral myocarditis in neonates. *J. Paediatr. Child. Health*, 2013, vol. 49, no. 9, pp. E451-454.
175. Schmidt N.J., Lennette E.H., Ho H.H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J. Infect. Dis.*, 1974, vol. 129, pp. 304-309.
176. Sejvar J. Neuroepidemiology and the epidemiology of viral infections of the nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*. 2014, vol. 123, pp. 67–87.
177. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., Cardoso M.J., McMinn P., Ooi M.H. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.*, 2010, vol. 10, no. 11, pp. 778–90.

178. Stanway G.F.B., P. Christian, Hovi T., Hyyhia T., King A.M.Q., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Skern T. Family Picornaviridae. Ed. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberg U., Ball L.A. Virus taxonomy, 8th Report of ICTV, 2005.
179. Suresh S., Forgie S., Robinson J. Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol.*, 2018, vol. 90, no. 1, pp. 3-7.
180. Tam P.E. Coxsackievirus myocarditis: interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease. *Viral Immunol.*, 2006, vol. 19, no. 2, pp. 133–146.
181. Tan E.L., Marcus K.F., Poh C.L. Development of RNA interference (RNAi) as potential antiviral strategy against enterovirus 70. *J Med Virol.*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 1025–1032.
182. Tapparel C., Junier T., Gerlach D., Van-Belle S., Turin L., Cordey S., Muhlemann K., Regamey N., Aubert J.D., Soccia P.M., Eigenmann P., Zdobnov E., Kaiser L. New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 5, pp. 719–726.
183. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.*, 2013, vol. 14, pp. 282–293.
184. Tee K.K., Lam T.T., Chan Y.F., Bible J.M., Kamarulzaman A., Tong C.Y., Takebe Y., Pybus O.G. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol*, 2010, vol. 84, no. 7, pp. 3339–3350.
185. The Picornavirus Pages. The Pirbright Institute, UK. Available online: <https://www.picornaviridae.com/sg3/enterovirus/enterovirus.htm> [accessed on Feb 2021].
186. Tracy S., Drescher K.M., Jackson J.D., Kim K., Kono K. Enteroviruses, type 1 diabetes and hygiene: a complex relationship. *Rev Med Virol*, 2010, vol. 20, no. 2, pp. 106-116.
187. Tuthill T.J., Gropelli E., Hogle J.M., Rowlands D.J. Picornaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2010, vol. 343, pp. 43–89.
188. van der Linden L., Wolthers K.C., van Kuppeveld FJ. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*, 2015, vol.7, no. 8, pp. 4529-62.
189. ViralZone. Picornaviridae. Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland. Available online: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html [accessed on Feb 2021].
190. Virus Taxonomy, EC 47, London, UK, July 2015. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
191. *Wkly Epidemiol Rec.* Cessation of use of trivalent oral polio vaccine and introduction of inactivated poliovirus vaccine worldwide. Sep 9 2016, vol. 91, no. 36-37, pp. 421-7
192. Xiang Z.; Li L.; Lei X.; Zhou H.; Zhou Z.; He B.; Wang J. Enterovirus 68 3C protease cleaves TRIF to attenuate antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 12, pp. 6650–6659.

193. Yarmolskaya M.S., Shumilina E.Y., Ivanova O.E., Drexler J.F., Lukashev A.N. Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 30 in Russia: different properties of genotypes and serotype. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, vol. 30, pp. 244-248.
194. Yi E.J., Shin Y.J., Kim J.H., Kim T.G., Chang S.Y. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 4-14.
195. Yin-Murphy M., Almond J.W. Picornaviruses. In: *Medical Microbiology*, 4th edition. Ed. Baron S., The University of Texas Medical Branch, 1996, 1273 p.
196. Zangwill K.M., Yeh S.H., Wong E.J., Marcy S.M. et al. Paralytic syndromes in children: epidemiology and relationship to vaccination. *Pediatric neurology*, 2010, vol. 42, no. 3, pp. 206-212.
197. Zhu F., Xu W., Xia J., Liang Z., Liu Y., Zhang X., Tan X., Wang L., Mao Q., Wu J. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N. Engl. J. Med.* 2014, vol. 370, no. 9, pp. 818–828.
198. Zou L., Yi L., Song Y., Zhang X., Liang L., Ni H., Ke C., Wu J., Lu J. A cluster of coxsackievirus A21 associated acute respiratory illness: the evidence of efficient transmission of CVA21. *Archives of Virology*, 2017, vol. 162, no. 4, pp. 1057–1059.