

**Филогенетические взаимоотношения эпидемически значимых для Беларуси неполиомиелитных энтеровирусов**

*ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

Ключевые слова: неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ), энтеровирусная инфекция (ЭВИ), генотипирование, филогенетический анализ.

На генетическом уровне подтверждена принадлежность доминирующих эпидемически значимых в Беларуси в период 1997-2007 гг. НПЭВ (ЕСНО 30, ЕСНО 6, Coxsackie B5, Coxsackie B4) к соответствующим серотипам вида Enterovirus B. Выявлена субтипная дифференциация циркулирующих НПЭВ на генетические субтипы в пределах серотипов. Доказано эволюционное родство белорусских энтеровирусных агентов с аналогичными серотипами НПЭВ, циркулирующими в других странах.

**Введение**

Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) являются одними из наиболее распространенных вирусных патогенов человека, вызывающих широкий спектр заболеваний различной степени тяжести. Для энтеровирусных инфекций (ЭВИ) характерен вспышечный характер заболеваемости, которая в короткий промежуток времени может охватывать большое количество населения на обширной территории, что обуславливает ее высокую социальную значимость и определяет актуальность осуществления регулярных молекулярно-эпидемиологических исследований, направленных на динамичное изучение циркуляции возбудителей в рамках единого мирового эпидемического пространства.

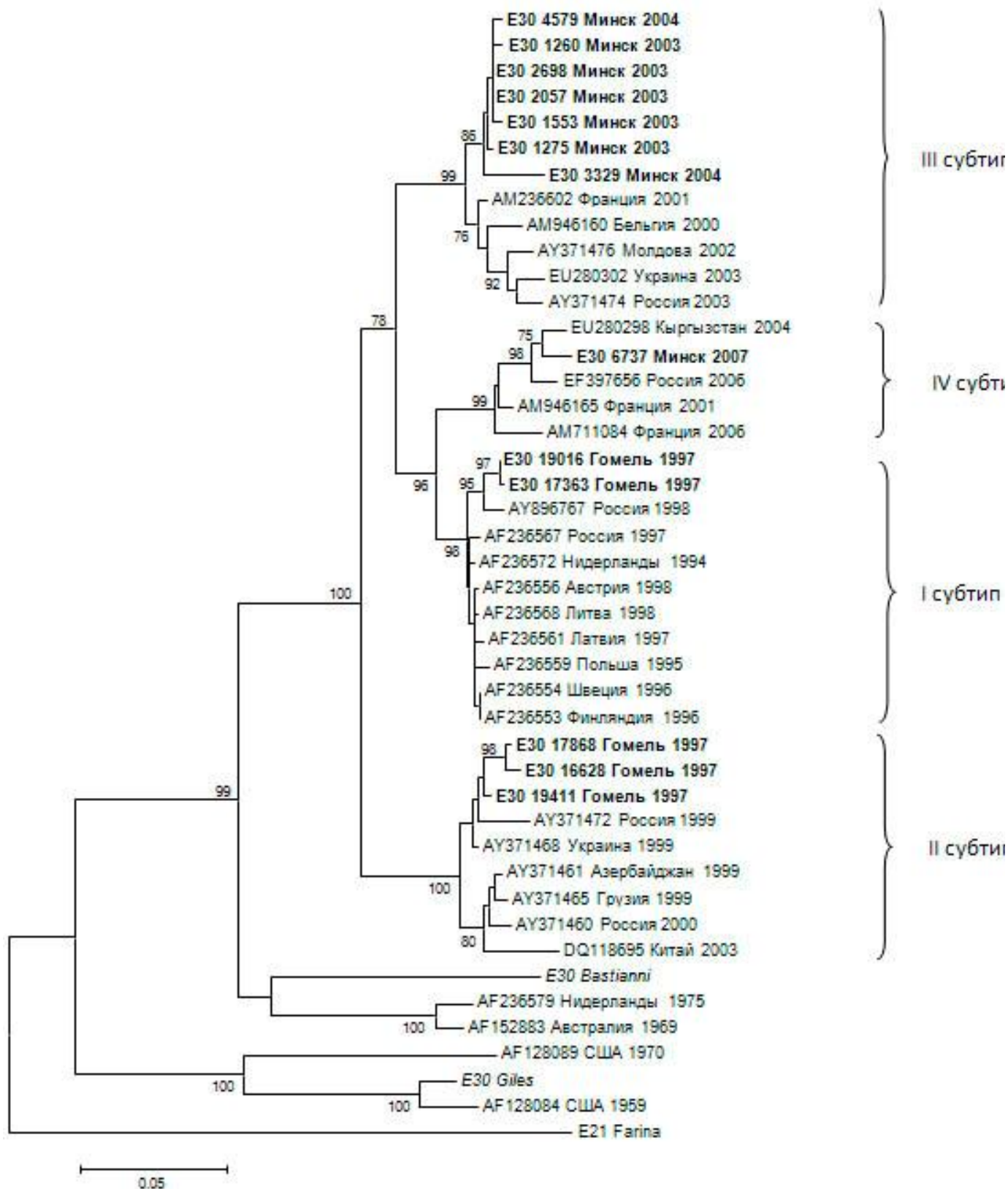
Целью настоящей работы было изучение филогенетических взаимоотношений эпидемически значимых для Беларуси НПЭВ с аналогичными серотипами, циркулирующими в других странах мира.

**Методы**

Выделение РНК НПЭВ осуществляли с помощью коммерческих наборов «Рибо-Сорб» (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии») и TRI Reagent (SIGMA). Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием набора RevertAid (Fermentas). Амплификацию и секвенирование участков VP1-кодирующего региона генома НПЭВ, проводили с помощью нескольких наборов праймеров, выбранных из литературы [1, 2, 3]. Секвенирование ДНК проводилось методом терминации цепи на автоматическом ДНК-анализаторе «ALFexpress II» (Amersham Biosciences). Поиск в базе данных GenBank осуществлялся с помощью интернет-программы BLAST. Компьютерный анализ последовательностей осуществлялся с помощью программы MEGA, версии 4 [4]. Генетические расстояния между последовательностями определяли на основании модели нуклеотидных замен Tamura-Nei [5]. Реконструкция филогенетических древ проводилась с помощью алгоритма neighbor-joining, встроенного в MEGA.

**Результаты**

В период 1997–2007 гг. первым серьезным обострением эпидемической ситуации была вспышка ЭВИ в г. Гомеле в 1997 г. В дальнейшем произошел ряд вспышек в разных регионах Беларуси: в г. Витебске (2001 г.), г. Минске (2003 г.), которая стала самой крупной из зарегистрированных, г. Полоцке (2007 г.). Этиологическими агентами заболеваемости во время этих вспышек были вирусы ЕСНО 30 (гг. Гомель, Минск), Coxsackie B5 (г. Минск), Coxsackie B4 (г. Витебск) и ЕСНО 6 (гг. Минск, Полоцк).



Цифры в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева – шкала генетического расстояния

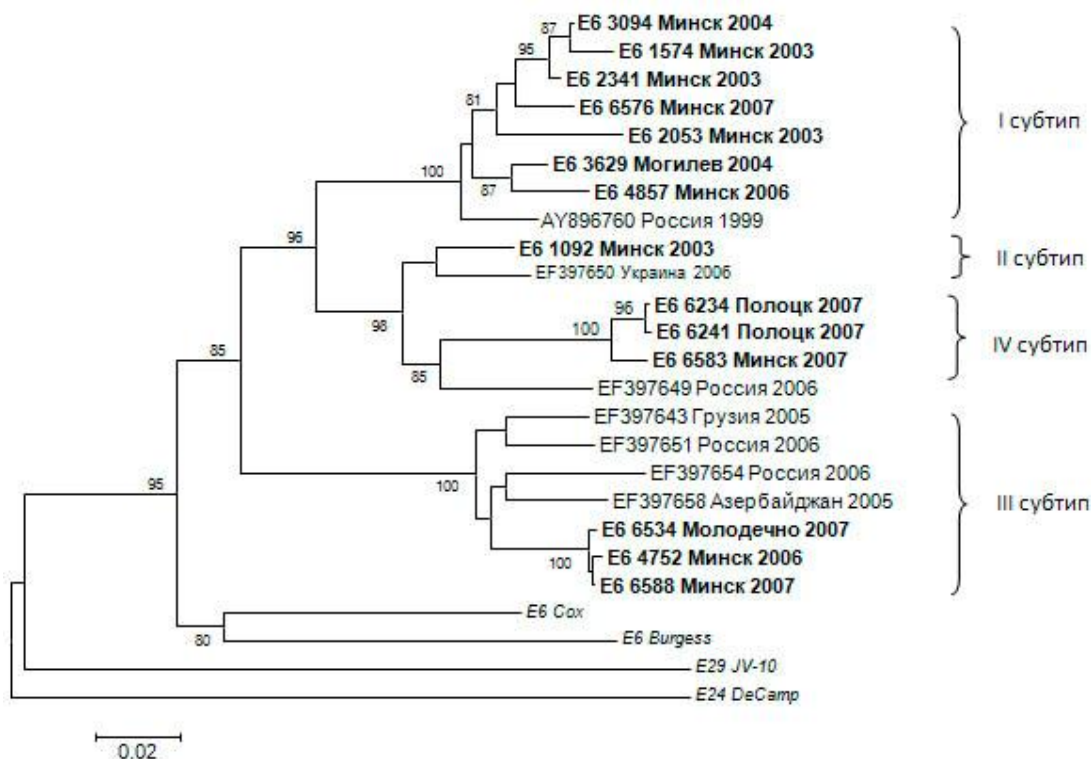
Рисунок 1 – Филогенетические взаимоотношения вирусов ЕСНО 30, циркулировавших в Республике Беларусь в 1997–2007 гг.

Филогенетический анализ выявил разделение вирусов ЕСНО 30 на четыре генетических субтипа (рис. 1). Вирусы ЕСНО 30 I субтипа, выделенные в г. Гомеле во

время вспышки ЭВИ в 1997 г. (№№ 17363 и 19016), группировались с вирусами, циркуляция которых была зафиксирована в Нидерландах, Финляндии, Австрии, Польше, Литве, Латвии, России и других странах Европы в период 1994–1998 гг. Изоляты ЕСНО 30 II субтипа (№№ 16628, 17868 и 19411), также являвшиеся этиологическими агентами вспышки ЭВИ в г. Гомеле в 1997 году, генетически были наиболее близки к вирусам, циркулировавшим в 1999–2000 гг. в России, Украине, Грузии, Азербайджане. Вирусы ЕСНО 30 субтипа I циркулировали к западу от Беларуси в период, предшествующий гомельской вспышке. Вирусы II субтипа были обнаружены к востоку от Беларуси только после гомельской вспышки 1997 года.

Циркуляция вирусов III субтипа была впервые выявлена в 2000 г. в Бельгии и в 2001 г. во Франции. Позднее данный геновариант ЕСНО 30 вызвал вспышки в Молдове, Украине, России и Беларуси в 2002–2003 гг. Изолят ЕСНО 30 IV субтипа № 6737 (2007 г.), группировался с вирусами, циркулировавшими во Франции, Кыргызстане и России в 2001–2006 гг.

Вирусы ЕСНО 6, циркулировавшие в разных регионах Беларуси в период 2001–2007 гг., также разделялись на четыре генетических субтипа (рис. 2). К субтипу I относились вирусы, циркулировавшие во время вспышки ЭВИ в г. Минске в 2003 году (№№ 1574, 2053, 2341), а впоследствии – вплоть до 2007 года (№№ 3094, 3629, 4857, 6576). Данный субтип отличался наиболее длительным временем циркуляции. В базе данных GenBank был обнаружен только один вирус, близкий к белорусским изолятам I субтипа, он был выделен в России в 1999 г. Во время вспышки ЭВИ в 2003 г. в г. Минске была зарегистрирована циркуляция и II субтипа ЕСНО 6 (№ 1092). Наиболее близким к нему был изолят из Украины, выделенный в 2006 году.



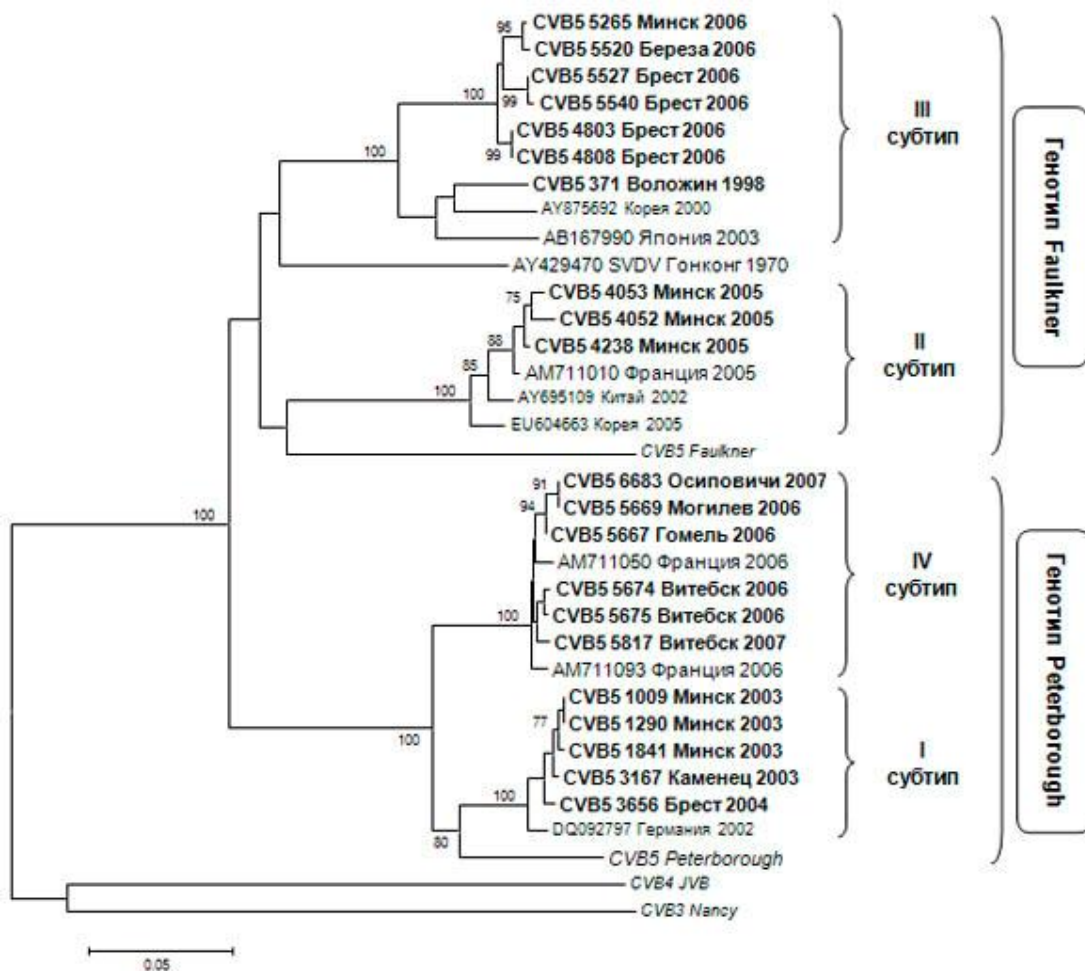
Цифры в узлах древа — процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию. Внизу слева — шкала генетического расстояния

Рисунок 2 – Филогенетические взаимоотношения вирусов ЕСНО 6, циркулировавших в Республике Беларусь в 2003–2007 гг.

Вирусы ЕСНО 6 третьего субтипа (№№ 4752, 6534, 6588), циркулировавшие в РБ в 2006–2007 гг. в гг. Минске и Молодечно, группировались в монофилетический кластер с изолятами, выделенными в 2005–2006 гг. в Азербайджане, Грузии и России.

Циркуляция вирусов IV субтипа ЕСНО 6 была зарегистрирована в Беларуси в 2007 году в гг. Минске и Полоцке (№№ 6583, 6234, 6241). Они вызвали локальную вспышку серозного менингита в г. Полоцке. Вирусов данного генетического субтипа в других странах по данным GenBank не обнаружено. Уровень генетической гетерогенности как в пределах субтипов, так и между ними, для вирусов ЕСНО 6 был значительно выше в сравнении с ЕСНО 30.

Вирусы Coxsackie B5, выделенные в Беларуси, принадлежали к двум крупным эволюционным линиям, генотипам прототипных штаммов Faulkner и Peterborough. В рамках генотипов Coxsackie B5 формировали более мелкие группы, генетические субтипы (рис. 3).



Числа в узлах древа – процент псевдореплик, поддерживающих данную топологию.

Внизу слева – шкала генетического расстояния.

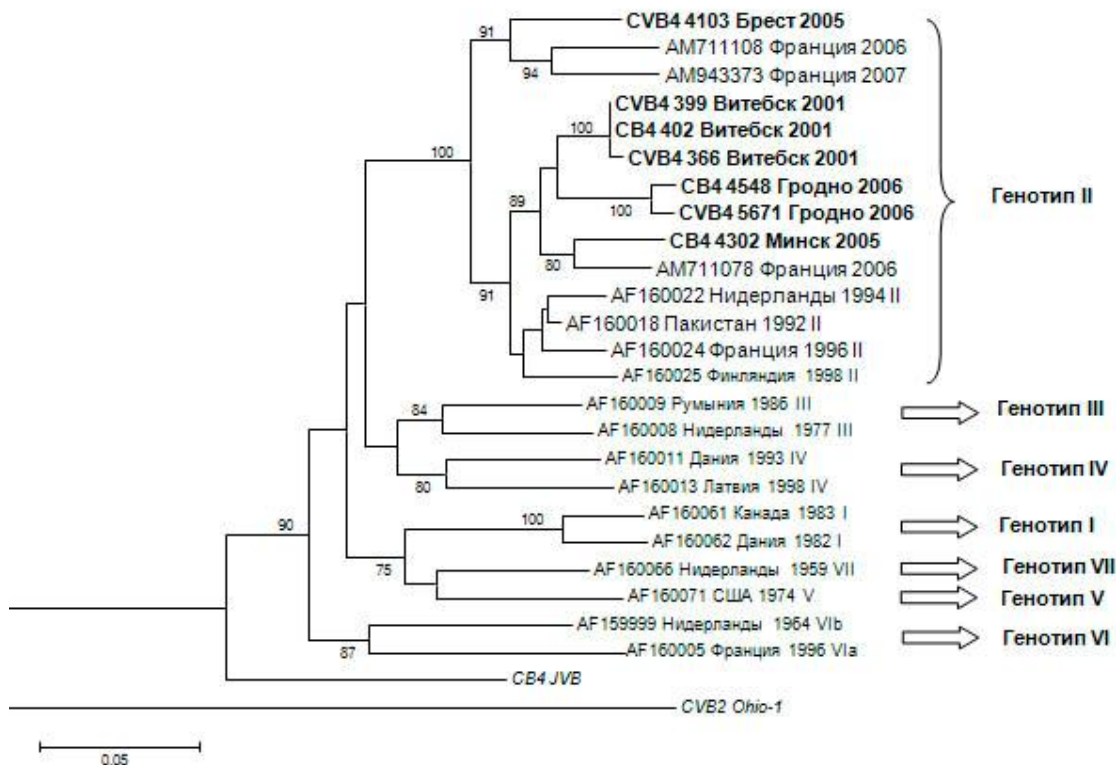
Рисунок 3 – Филогенетические взаимоотношения вирусов Coxsackie B5, циркулировавших в Беларуси в 1998–2007 гг.

К субтипу I принадлежали вирусы, циркулировавшие во время вспышек ЭВИ в РБ в 2003 году в г. Минске (№№ 1009, 1290, 1841) и в Брестской области (№ 3167), а также в 2004 году в г. Бресте (№ 3656). Эволюционно близким к ним оказался вирус, выделенный в Германии в 2002 г.

Субтип II представлен вирусами, циркулировавшими в 2005 году, выделенными в г. Минске из проб клинического материала (№№ 4052, 4053) и из сточной воды (№ 4238), а также изолятами из Франции (2005 г.), Китая (2002 г.) и Кореи (2005 г.).

Вирусы III субтипа циркулировали в Минск, Бресте и Брестской области в 2006 г. Генетически близких к ним вирусов из других странах в GenBank обнаружено не было.

Четвертый субтип Coxsackie B5 был представлен, помимо белорусских изолятов 2006–2007 гг., циркулировавших в разных регионах Беларуси (Витебской, Могилевской и Гомельской областях), вирусами, выделенными во Франции в 2006 г. I и IV субтипы принадлежали к генотипу Peterborough и отличались крайне низкой генетической гетерогенностью, свойственной этому генотипу. II и III субтипы, относившиеся к генотипу Faulkner, были значительно более гетерогенны. Для Coxsackie B5 была характерна последовательная смена циркулирующих генетических вариантов, принадлежащих при этом к двум отличным генетическим линиям.



Числа в узлах древа – процент псевдореplik, поддерживающих данную топологию.

Внизу слева – шкала генетического расстояния.

Рисунок 4 – Филогенетические взаимоотношения вирусов Coxsackie B4, циркулировавших в Беларуси в 2001-2006 гг.

Вирусы Coxsackie B4, циркулировавшие в Беларуси, принадлежали ко II генотипу Coxsackie B4, наиболее широко представленному в настоящее время в мире (рис. 4). С белорусскими изолятами группировались вирусы, циркулировавшие в 1990-х годы в Европе и Пакистане. Наибольшим уровнем генетического сходства отличались вирусы, выделенные во время вспышки в г. Витебске в 2001 г. (№№ 366, 394, 399, 402, 403).

Выводы

В период 1997–2007 гг. доминирующими эпидемически значимыми для Республики Беларусь возбудителями ЭВИ были вирусы ЕСНО 30, ЕСНО 6, Coxsackie B5 и Coxsackie

В4, которые относились к виду Enterovirus В, что подтверждено результатами генотипирования.

Вирусам ЕСНО 30 и Coxsackie В5 была свойственна последовательная смена циркулирующих на конкретной территории генетических субтипов, появление которых, как правило, сопровождалось обострением эпидемической ситуации. Вирусы ЕСНО 6 характеризовались продолжительной циркуляцией одного генетического субтипа и возможностью одновременной циркуляции нескольких субтипов, не связанной с определенным географическим регионом. Вирусы ЕСНО 30 и ЕСНО 6 дифференцировались на 4 генетических субтипа в пределах одного генотипа, вирусы Coxsackie В5 – на два генотипа, каждый из которых разделялся на 2 генетических субтипа, вирусы Coxsackie В4 принадлежали к одному генотипу, который не разделялся на генетические субтипы.

Большинство выявленных в Беларуси в 1997–2007 гг. геновариантов изученных НПЭВ были филогенетически близки энтеровирусным агентам, циркулировавшим в этот период в странах ближнего и дальнего зарубежья – России, Украине, Литве, Польше, Грузии, Финляндии, Австрии, Германии, Франции, США, Корею, Китае и других

### **Литература**

1. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification / M. S. Oberste [et al.] // J. Virol. 1999. Vol. 73, № 3. P. 1941–1948.
2. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products / I. Casas [et al.] // J. Med. Virol. 2001. Vol. 65. P. 138–148.
3. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak / A. Mirand [et al.] // J. Med. Virol. 2006. Vol. 78. P. 1624–1634.
4. Tamura, K. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
5. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // Mol. Biol. Evol. 1993. Vol. 10. P. 512–526