

А.В. Демина¹, В.А. Терновой¹, Б.Б. Дарижапов², Т.В. Якубич³, А.О. Семенцова¹, О.К. Демина¹,
Е.В. Протопопова¹, В.Б. Локтев¹, А.П. Агафонов¹, С.В. Нетесов^{1,4}

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская обл.

² Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Сахалинской области

³ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области»

⁴ ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Вспышка острой кишечной инфекции энтеровирусной этиологии в Сахалинской области в августе 2010 года

В данной статье описано расследование случаев острой кишечной инфекции (ОКИ), зарегистрированных в Сахалинской области в августе 2010 г. Проведены эпидемиологические и молекулярно-биологические исследования. После скринингового ПЦР-исследования на различные возбудители ОКИ и определения нуклеотидных последовательностей в положительных образцах были идентифицированы энтеровирусы: Коксаки А2 — 42 образца (45%), Коксаки А4 — 31 образец (34%), энтеровирус 71 — 6 образцов (6,5%), Коксаки В5 — 6 образцов (6,5%), Коксаки В3 — 4 образца (4%) и Коксаки В1 — 4 образца (4%). Филогенетический анализ показал, что наиболее близкие по нуклеотидным последовательностям прототипы этих генотипов уже выявлены в Японии, Корее и Китае в 2000–2010 гг.

Ключевые слова: острая кишечная инфекция, энтеровирусы, Коксаки А2, А4.

64

Введение

Энтеровирусная диарея (гастроэнтерит) — острое лихорадочное заболевание с поражением желудочно-кишечного тракта; преимущественно болеют дети младшего возраста, реже взрослые люди [1]. Вспышки энтеровирусного гастроэнтерита чаще бывают локальными. Крупные эпидемии встречаются крайне редко.

Главными этиологическими агентами энтеровирусной диареи в настоящее время считаются вирусы Коксаки А 18, 20, 21, 22, 24 и ЕСНО 11,14,18 [1], однако ее причинами могут быть и другие энтеровирусы.

1 августа 2010 г. в г. Южно-Сахалинске началась вспышка заболеваемости острыми кишечными инфекционными заболеваниями (ОКИ). До 31 июля 2010 г. в Южно-Сахалинске отмечалась обычная фоновая заболеваемость ОКИ. Влияние действия фактора, вызвавшего подъем заболеваний, с учетом инкубационного периода имело место с 25 по 31 июля 2010 г. На 32-й неделе показатель инфекционной заболеваемости ОКИ в Южно-Сахалинске превысил недельный максимальный среднесезонный показатель в 4,5 раза. В это же время заболеваемость ОКИ в других городах Сахалинской области была в пределах фоновой. Подъем инфекционной забо-

A.V. Demina¹, V.A. Ternovoi¹, B.B. Darizhapov², T.V. Yakubich³, S.A. Sementsova¹, O.K. Demina¹,
E.V. Protopopov¹, V.B. Loktev¹, A.P. Agafonov¹, S.V. Netesov^{1,4}

¹ FSRE State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR

² Department of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Sakhalin region

³ Center of Hygiene and Epidemiology in the Sakhalin region

⁴ Novosibirsk State University

Outbreak of acute enterovirus intestinal infection in Sakhalin region in August 2010

The investigation of cases of acute intestinal infections in the Sakhalin region of Russia in August, 2010 is described. Epidemiological and molecular biological studies were conducted. After initial PCR screening and determining the nucleotide sequences of the positive samples the following enteroviruses were found: Coxsackie A2 — 42 samples (45%), Coxsackie A4 — 31 sample (34%), Enterovirus 71 — 6 samples (6,5%), Coxsackievirus B5 — 6 samples (6,5%), Coxsackie B3 — 4 samples (4%) and Coxsackie B1 — 4 samples (4%). The phylogenetic analysis of sequences showed that the closest analogues for the nucleotide sequences of these genotypes were previously identified in Japan, Korea and China in 2000–2010.

Key words: acute intestinal infection, enterovirus, Coxsackievirus A2, A4.

леваемости ОКИ в Южно-Сахалинске продолжался в течение 7 недель. В динамике с 01.08.2010 г. отмечалось нарастание инфекционной заболеваемости в течение двух недель, пиковой ситуацией на третьей неделе и последующим снижением в течение 4 недель. Всего за данный период зарегистрировано 1439 случаев острых кишечных инфекционных заболеваний.

Целью настоящей работы явилось расследование случаев острой кишечной инфекции, зарегистрированных в Сахалинской области в августе 2010 г., выявление и идентификация возбудителя заболевания, а также его разновидность.

Материалы и методы

Биологический материал от больных, пробы внешней среды для подтверждения этиологии энтеровирусной инфекции и связи с внешней средой были направлены в Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦВБ «Вектор»).

В лаборатории молекулярной вирусологии РНК-содержащих вирусов (ФБУН ГНЦВБ «Вектор») были проанализированы образцы фекалий от 100 пациентов с ОКИ, 1 проба воды насосной и 1 проба 20% сметаны (ОАО «Южно-Сахалинский молочный комбинат»), поступившие из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области» (ФГУЗ ЦГиЭ) 01 сентября 2010 г. Для исследования были отобраны пробы, положительные только на энтеровирусы (при предварительном исследовании методом обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в вирусологической лаборатории ФГУЗ ЦГиЭ). Материал был доставлен самолетом в термоконтейнере с хладагентами. В лаборатории ФБУН ГНЦВБ «Вектор» образцы хранились при температуре минус 70°C.

Суспензию фекалий готовили интенсивным перемешиванием на приборе «Vortex» (1–3 г материала в 500 мкл 0,1М натрий-фосфатного буфера pH 7,4); центрифугировали 15 мин при 4800 g для удаления нерастворимого дэбриса. Полученный супернатант хранили при минус 70°C и применяли в дальнейшем исследовании.

Выделение РНК/ДНК из 100 мкл супернатанта исследуемого материала проводили с использованием набора реагентов «РИБО-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) [2]; реакцию обратной транскрипции — с использованием набора реагентов «Реверта-Л» (ЦНИИЭ, Россия) [2].

Все образцы были исследованы на наличие адено-, норо-, астро-, рота-, энтеровирусов, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) наборами «АмплиСенс» (ЦНИИЭ, Россия) [2].

Дополнительно все образцы были исследованы на энтеровирусы методом ПЦР с использованием лабораторного набора олигонуклеотидных праймеров (ФБУН ГНЦВБ «Вектор») для выявления энтеровирусов вида А, В, С, D (праймеры рассчитаны на 5'-UTR):

5'→3' 5' CAAGNACTTCTGTTNCCCCGGACYGA 3'

3'←5' 5' ATNTNTCAATTGTCAACATAAGCAGCCA 3'

(рассчитанный и экспериментально проверенный нами данный набор праймеров защищен Патентом РФ №2011125215, дата приоритета 17.06.2011)

Аmplification осуществляли в 30 мкл реакционной смеси, содержащей по 0,2 мМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1,5 мМ MgCl₂, 30 мМ трис-HCl (pH 8,5 при +25°C), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Nonidet P40 (Sigma), по 0,15 мкМ специфических олигонуклеотидных праймеров и 1,5 ед Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия). Температурные условия амплификации для указанных праймеров: 95°C — 10 сек, 60°C — 1 мин, 45 циклов.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

После проведения ПЦР с праймерами к 5'-UTR фрагменты очищали с использованием набора «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System» (Promega, США) и секвенировали по обоим цепям.

Определение нуклеотидных последовательностей проводилось с использованием автоматического секвенатора «ABI 3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности анализировались с помощью программы Lasergene 7. Полученные данные сравнивались с нуклеотидными последовательностями базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [3].

Филогенетический анализ осуществляли с использованием программы MEGA 4 [4]. Для оценки достоверности группирования применяли бутстреп-тест [5]. Топология деревьев была восстановлена при помощи метода объединения ближайших соседей. Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Кимуры с двухпараметрической метрикой.

Суспензии первичных образцов фекалий были также использованы для заражения культуры клеток *Vero* с целью выделения вируса. После инфицирования монослоя клеток проведено три последовательных пассажа с контролем накопления инфекционного агента методом ПЦР.

Клеточная культура *Vero* была получена из банка культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и поддерживалась на среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плода коровы и 80 мкг/мл сульфата гентамицина.

Для выделения вируса к монослою клеток *Vero*, выращенных в пластиковых культуральных флаконах (25 см²), добавляли 500 мкл супернатанта первичного образца, предварительно фильтрованного через нитроцеллюлозные мембраны (Millipore, США) с диаметром пор 0,45 мкм. После одного часа адсорбции при 37°C монослой заливали средой DMEM (БиолоТ, Россия) с 2% сывороткой крупного рогатого скота (Россия) и инкубировали в термостате при 37°C. Учет результатов проводили через 5 суток. Репликацию вируса оценивали по цитопатическому действию визуально в микроскоп и методом ПЦР 5'-UTR энтеровирусов.

Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (ред. Указ Президента РФ от 24.12.1993 Т2288, Федеральные законы № 30-ФЗ от 02.03.1998, № 214-ФЗ от 20.12.1999).

Результаты

В возрастной структуре заболевших доля взрослых составила 30,3%, дети до 17 лет — 69,7%. Среди возрастных категорий в перерасчете на 100 тыс. населения максимальный показатель заболеваемости регистрировался среди детей от 1 до 2 лет (6857,8), на втором месте — дети 3–6 лет (3963,3), на третьем — дети до 1 года (3274,3),

самый низкий показатель заболеваемости острыми кишечными инфекциями был у взрослых (301,3).

Из клинических форм преимущественно преобладал острый гастроэнтерит — 63,9%, в остальных случаях — пищевая токсикоинфекция. В 49,2% регистрировалась легкая форма тяжести заболеваний острыми кишечными инфекциями, в 50,8% — среднетяжелая; случаев с тяжелой формой не зарегистрировано. 69,2% пострадавших получили медицинскую помощь в амбулаторно-поликлинических условиях.

Необходимо отметить, что у значительной части взрослого населения преобладала легкая форма заболевания, вследствие чего они не обращались за медицинской помощью и не были учтены в данной статистике. Проведенный анонимный анкетный опрос 500 человек среди населения Южно-Сахалинска выявил 35% лиц, имевших признаки острых кишечных заболеваний и не обращавшихся за медицинской помощью.

Дети, не посещавшие детские образовательные и дошкольные учреждения, болели в 5,8 раз чаще, чем организованные дети.

При анализе эпидемиологической ситуации была установлена прямая связь подъема инфекционной забо-

леваемости ОКИ с ремонтными работами по устранению повреждений на сетях централизованного водоснабжения за период с 20.07.10 по 10.08.10 год.

Оценка данных эпидемиологического обследования домашних очагов показала, что заболевшие чаще употребляли молочную и кисломолочную продукцию местного производства, чем незаболевшие. В факторном анализе преимущественно фигурировали молоко — 56,8%, кисломолочная продукция — 44,2%. Таким образом, наиболее вероятными факторами передачи явились питьевая вода, молочные и кисломолочные продукты местного производства. Регистрация случаев больных ОКИ среди персонала предприятий, производящих молочную продукцию, также подтвердила данное предположение.

По результатам лабораторной диагностики проб от заболевших людей на бактериологические показатели отмечался низкий процент условно-патогенной микрофлоры (от 10,2 до 13,4% случаев), патогенная бактериальная микрофлора не была выявлена. Это позволило предположить вирусную природу инфекционного заболевания.

Вирусологической лабораторией ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области» были проведены исследования фекалий от больных ОКИ на аденовирусы группы F, астровирусы, вирусы Норфолк методом ПЦР наборами «АмплиСенс» (ЦНИИЭ, Россия [2]) — все образцы были отрицательными. Исследование на ротавирусы выявило 11 (0,5%) положительных образцов. В то же время у больных ежедневно увеличивался процент лабораторно подтвержденных случаев энтеровирусной инфекции. Кроме того, этой же лабораторией в пробах воды насосной № 28 централизованного водоснабжения и пробе 20% сметаны методом ОТ-ПЦР была обнаружена РНК энтеровирусов.

Таким образом, низкий процент бактериально подтвержденных случаев ОКИ и значительное число лабораторно подтвержденных случаев энтеровирусной инфекции позволили предположить ведущим этиологическим агентом подъема заболеваемости энтеровирусную инфекцию.

Изучение проб в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» показало, что в исследованных клинических образцах генетический материал (вирусные РНК или ДНК) адено-, норо-, астро-, ротавирусов, а также ДНК *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* отсутствует.

В 91 образце фекалий, в 1 пробе воды насосной и 1 пробе 20% сметаны (91% проб) нами была обнаружена РНК энтеровирусов, из которых 51 образец (56%) — от детей в возрасте до 14 лет. После определения нуклеотидных последовательностей амплификационных фрагментов ДНК в положительных образцах были идентифицированы энтеровирусы: Коксаки А2 — 42 образца (45%), Коксаки А4 — 31 образец (34%), энтеровирус 71 — 6 образцов (6,5%), Коксаки В5 — 6 образцов (6,5%), Коксаки В3 — 4 образца (4%) и Коксаки В1 — 4 образца (4%).

Филогенетический анализ показал, что наиболее близкие по нуклеотидным последовательностям прототипы этих генотипов ранее были выявлены в Японии, Корее и Китае в 2000–2010 гг. (рис. 1, 2).

После проведения 3 последовательных пассажей на культуре клеток *Vero* были выделены и первично охарактеризованы штаммы Коксаки А2 (штамм Sah51), А4 (штамм Sah5) и Коксаки В5 (штамм Sah2).

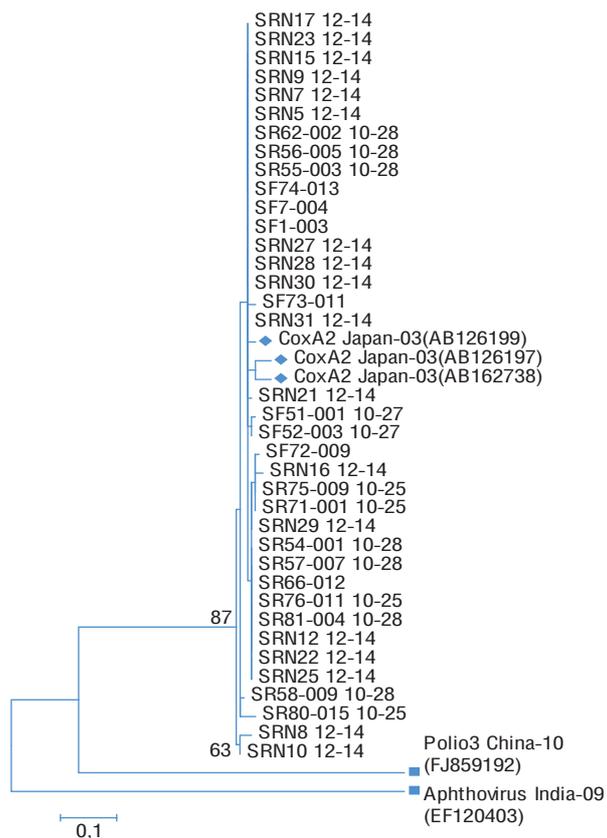


Рис. 1 . Филогенетическое древо энтеровирусов Коксаки А2, построенное по последовательности фрагмента гена 5'UTR (с 73 по 520 п.о.). Топология дерева восстановлена при помощи метода объединения ближайших соседей. Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Кимуры с двухпараметрической метрикой

Примечание. * — ввиду большого количества определенных нуклеотидных последовательностей построено два филогенетических древа; наиболее гомологичные последовательности не включены. ** — прототипные штаммы; *** — ауtgруппа (группа сравнения); SRN, SR, SF — идентификационные номера исследуемых образцов.

Заключение

Проведено расследование вспышки острой кишечной инфекции в Сахалинской области в августе 2010 г.

По результатам лабораторных исследований, в биологическом материале от больных в 79% обнаружены РНК энтеровирусов Коксаки А2, Коксаки А4. Связь с водным фактором подтвердили обнаруженные РНК энтеровирусов Коксаки А2 в пробе воды питьевой, отобранной на насосной № 28 распределительной сети централизованного водоснабжения Южно-Сахалинска, связь с молочной продукцией — обнаруженные РНК энтеровирусов Коксаки А2 в пробе 20% сметаны.

Филогенетический анализ показал, что наиболее близкие по нуклеотидным последовательностям штаммы этих генотипов энтеровирусов были выявлены в Японии в 2003 г. (*P-2242/CA2/Kanagawa/2003 (Published Only in Database (2008) AB126199)*, *P-2181/CA2/Kanagawa/2003 (Published Only in Database (2008) AB126197)*, *P-2329/CA2/Kanagawa/2003 (Published Only in Database (2008) AB162738)* — для Коксаки А2 и *P-2232/CA4/Kanagawa/2003 (Published Only in Database (2008) AB126200)* — для Коксаки А4).

На фоне выявления основных серотипов Коксаки А2 и А4 в 21% случаев нами обнаружены другие энтеровирусы (Коксаки В5, Коксаки В3, Коксаки В1, энтеровирус 71) у людей с признаками энтеровирусной инфекции.

Филогенетический анализ показал, что наиболее близкие по нуклеотидным последовательностям штаммы этих генотипов энтеровирусов были выявлены в Японии в 2003 г. для Коксаки В1 (*P-2346/CB1/Kanagawa/2003 [Published Only in Database (2008)] AB162750*), в Японии в 2010 г. для энтеровирусов 71 (*1095-LPS1; AB550333* [6]), в Китае в 2006 г. для Коксаки В3 (*SSM-CVB3 GU109481* [7]), в Корею в 2000 г. для Коксаки В5 (*2000/CSF/KOR [Published Only in Database (2005)] AY875692*).

Определенные нуклеотидные последовательности (фрагменты 5'UTR) задепонированы нами в GenBank (от 23.08.2011 г. JN603367 — JN603368).

Настоящая работа выполнена за счет финансирования гранта НШ-65387.2010.4 по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации, Госконтракту № 02.740.11.0767 «Выявление вирусных возбудителей заболеваний, актуальных для здравоохранения Западной Сибири (гепатиты, гастроэнтериты, серозный менингит), изучение их генетического разнообразия в целях разработки и совершенствования диагностикумов» и Договору НГУ с Министерством обра-

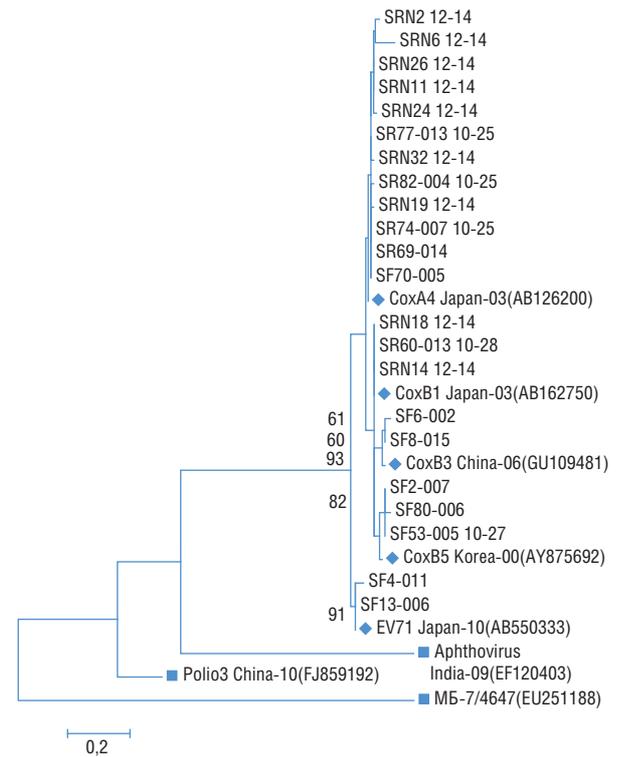


Рис. 2. Филогенетическое древо энтеровирусов Коксаки А4, В1, В3, В5, EV71, построенное по последовательности фрагмента гена 5'UTR (с 73 по 520 п.о.). Топология дерева восстановлена при помощи метода объединения ближайших соседей. Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Кимуры с двухпараметрической метрикой
Примечание. * — прототипные штаммы; ** — аутогруппа (группа сравнения); SRN, SR, SF — идентификационные номера исследуемых образцов.

зования и науки № 11.G34.31.0034 «Новые подходы к разработке лекарств: поиск, отбор и конструирование непатогенных для человека штаммов вирусов, перспективных для использования в качестве онколитических препаратов».

REFERENCES

1. Pallansch M.A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields' Virology*. (Ed. D.N. Knipe et al.) 5th Ed. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*. 2007. P. 839–893.
2. URL: <http://www.interlabservice.ru/catalog/reagents/index.php?sid=678>
3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* 2008; 9: 299–306.
5. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783–791.
6. Miyamura K., Nishimura Y., Abo M. et al. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (2): 287–291.
7. He W., Lu H., Song D. et al. The evidence of Coxsackievirus B3 induced myocarditis as the cause of death in a Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*). *J. Med. Primatol.* 2009; 38 (3): 192–198.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Демина Анна Владимировна, врач-инфекционист, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии РНК-вирусов ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово
Тел.: (383) 363-48-25, (913) 986-20-15
E-mail: deminaanna@mail.ru

Терновой Владимир Александрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии РНК-вирусов ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-48-25

Е-mail: tern@vector.nsc.ru

Дарижапов Борис Бутитович, руководитель управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Сахалинской области

Адрес: 693020, Южно-Сахалинск, ул. Чехова, д. 30а

Тел.: (4242) 49-52-00/49-53-00

Е-mail: sakhnadzor@sakhalin.ru

Якубич Татьяна Викторовна, заведующая эпидемиологическим отделом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области»

Адрес: 693020, Южно-Сахалинск, ул. Хабаровская, д. 45

Тел.: (4242) 46-03-06, факс: (4242) 42-22-22

Е-mail: sakhfguz@sakhfguz.ru, <http://www.sakhfguz.ru>

Семенцова Александра Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии РНК-вирусов ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-48-25

Е-mail: sementsova@vector.nsc.ru

Демина Ольга Константиновна, научный сотрудник отдела диагностики инфекционных заболеваний ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-47-12

Е-mail: demina@vector.nsc.ru

Протопопова Елена Викторовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-47-53

Е-mail: eprotopopova@ngs.ru

Локтев Валерий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-47-53

Е-mail: loktev@vector.nsc.ru

Агафонов Александр Петрович, кандидат биологических наук, заместитель генерального директора по научной работе ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

Тел.: (383) 363-47-12

Е-mail: agafonov@vector.nsc.ru

Нетесов Сергей Викторович, доктор биологических наук, профессор, проректор по научной работе, руководитель лаборатории бионанотехнологий ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Адрес: 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

Тел.: (383) 339-40-02

Е-mail: nauka@nsu.ru