

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ В ДЕТСКОМ МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

А.В. Сергеева¹, Л.Ю. Послова², О.В. Ковалишена¹, А.С. Благодравова¹,
Н.В. Епифанова³, Т.А. Сашина³, О.В. Морозова³, Н.А. Новикова³

¹ ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия

² ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, г. Нижний Новгород, Россия

³ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,
г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. На территории РФ в общей структуре острых кишечных инфекций удельный вес вирусных диарей среди детей колеблется в зависимости от сезона от 24 до 78% случаев. Этиологическая расшифровка вирусных острых кишечных инфекций проводится в основном среди пациентов инфекционных стационаров. Вопрос о распространенности вирусных острых кишечных инфекций в неинфекционных стационарах, в том числе как инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, остается недостаточно исследованным. Определение доли вирусного компонента в общей структуре острых кишечных инфекций сводится преимущественно к определению процентного соотношения ротавирусной инфекции без учета других возбудителей. В рамках эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями вирусной этиологии в детском многопрофильном неинфекционном стационаре проведено изучение этиологической структуры вирусных острых кишечных инфекций и молекулярно-генетическая характеристика выявленных кишечных вирусов. Была внедрена синдромальная диагностика случаев острых кишечных инфекций — выявление и обследование пациентов с признаками дисфункции желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием. Комплекс лабораторных методов включал: выявление и дифференциация ДНК (РНК) различных кишечных возбудителей методом ОТ-ПЦР; генотипирование кишечных вирусов методом секвенирования; анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов кДНК с применением пакета программ BLAST для идентификации близкородственных штаммов и онлайн-сервиса для автоматического генотипирования норовирусов Norovirus Genotyping Tool Version 1.0. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA. Полученные последовательности фрагментов генома представлены в международной базе данных GenBank. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволило дифференцировать вирусных возбудителей острых кишечных инфекций и установить факт внутрибольничной передачи. Доля острых кишечных инфекций вирусной этиологии среди пациентов, имеющих клинические признаки кишечной инфекции, и контактных лиц составила 43,8%.

Адрес для переписки:

Сергеева Анжелика Вячеславовна
603950, Россия, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, ГБОУ ВПО Нижегородская государственная
медицинская академия МЗ РФ.
Тел.: 8 (831) 436-94-81; 8 (903) 060-39-84 (моб.).
Факс: 8 (831) 439-01-63.
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

Contacts:

Anzhelika V. Sergeeva
603950, Russian Federation, GSP-470, Nizhny Novgorod, Minina
and Pozharskogo sq., 10/1, Nizhny Novgorod State Medical Academy.
Phone: +7 (831) 436-94-81; +7 (903) 060-39-84 (mobile).
Fax: +7 (831) 439-01-63.
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

Библиографическое описание:

Сергеева А.В., Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Благодравова А.С.,
Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А.
Молекулярно-генетический мониторинг острых кишечных инфекций
вирусной этиологии в детском многопрофильном стационаре //
Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 243–252.
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252

Citation:

Sergeeva A.V., Poslova L.Y., Kovalishena O.V., Blagoravova A.S.,
Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A. Viral etiology
acute intestinal infections molecular monitoring in children's hospital //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015,
vol. 5, no. 3, pp. 243–252. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252

Этиологическая структура кишечных вирусов была представлена норовирусами (73,2%) генотипов GII.1, GII.3, GII.4 Sydney 2012, ротавирусами (23,2%) генотипов G4P[8] и G1-IP[8], а также аденовирусами (1,8%) группы F и астровирусами (1,8%) генотипов 1 и 2. Среди госпитализированных детей было 9 случаев заноса острых кишечных инфекций вирусной этиологии и 66 случаев носили внутрибольничный характер. Обследование объектов окружающей среды выявило наличие контаминации вирусами кишечной группы в 47,8% случаев.

Ключевые слова: норовирусы, ротавирусы, аденовирусы, астровирусы, острая кишечная инфекция, молекулярно-генетический мониторинг.

VIRAL ETIOLOGY ACUTE INTESTINAL INFECTIONS MOLECULAR MONITORING IN CHILDREN'S HOSPITAL

Sergeeva A.V.^a, Poslova L.Y.^b, Kovalishena O.V.^a, Blagonravova A.S.^a, Epifanova N.V.^c, Sashina T.A.^c, Morozova O.V.^c, Novikova N.A.^c

^a Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b The State Budget Hospital Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^c Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. On the territory of the Russian Federation in the overall structure of acute intestinal infections the proportion of viral diarrhea among children varies from 24 to 78% of cases depending on the season. The acute viral intestinal infections etiological confirmation is performed mainly among patients of infectious hospitals. The prevalence of viral acute intestinal infections in non-infectious hospitals, including infections associated with medical care, remains unclear. Currently estimation of viral component in the acute intestinal infections overall structure mainly consists in determination of rotavirus infection prevalence excluding other pathogens. As the part of viral etiology hospital infections epidemiological surveillance in non-infectious children's hospital the study of acute viral intestinal infections etiological structure and molecular genetics characterization of identified enteric viruses is conducted. The syndrome diagnosis of acute intestinal infections cases was introduced — an identification and evaluation of patients with signs of dysfunction of the gastrointestinal tract, that is not related to the underlying disease. A set of laboratory methods included identification of various intestinal pathogens DNA (RNA) by PCR-RT method; genotyping of enteric viruses using sequencing; nucleotide sequence analysis of cDNA fragments using the BLAST software package for identification of closely related strains and an online service for automatic genotyping of noroviruses by Norovirus Genotyping Tool Version 1.0. Alignment of nucleotide sequences and phylogenetic analysis was performed using the software MEGA 5.0. The obtained sequence fragments of the genome was downloaded in GenBank international database. The use of molecular genetics research methods allowed to differentiate viral pathogens of acute intestinal infections and to establish the fact of nosocomial transmission. The proportion of viral etiology acute intestinal infections in patients with clinical signs of intestinal infection, and contact persons was 43.8%. The etiological structure of intestinal virus infections was presented by noroviruses (73.2%) genotypes GII.1, GII.3, GII.4 Sydney 2012, rotaviruses (23.2%) genotypes G4P[8] and G1-IP[8], and adenovirus (1.8%) of the group F and astroviruses (1.8%) genotypes 1 and 2. Among the hospitalized children were 9 cases of viral etiology acute intestinal infections importation, and 66 of cases were of nosocomial origin. Examination of the environment revealed the presence of contamination by enteric viruses in 47.8% of cases.

Key words: noroviruses, rotaviruses, adenoviruses, astroviruses, acute intestinal infection, molecular-genetic monitoring.

Введение

В настоящее время большинство острых кишечных инфекций (ОКИ) имеет вирусную природу, особенно среди детского населения. В РФ в общей структуре ОКИ на долю вирусных диарей у детей приходится от 24% в летнее время года и до 70–78% в осенне-зимний период [7]. Спектр кишечных вирусов весьма разнообразен и включает представителей двенадцати родов восьми различных семейств: *Reoviridae* (род *Rotavirus*), *Caliciviridae* (роды *Norovirus*, *Sapovirus*), *Adenoviridae* (род *Mastadenovirus*), *Astroviridae* (род *Astrovirus*), *Picornaviridae* (роды *Enterovirus*, *Par-*

echovirus, *Kobuvirus* — агент Аичи), *Coronaviridae* (роды *Coronavirus*, *Torovirus*), *Parvoviridae* (род *Bocavirus*), *Picobirnaviridae* (род *Picobirnavirus*) [12]. По данным многолетних региональных исследований, среди населения Нижнего Новгорода циркулируют представители одиннадцати родов [3].

Определение этиологической структуры вирусных ОКИ в основном проводится среди пациентов медицинских организаций инфекционного профиля [2, 3, 4, 5]. Вопрос о распространенности вирусных ОКИ в неинфекционных стационарах, в том числе как инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

(ИСМП), остается недостаточно исследованным. Более изучена в этом плане ротавирусная инфекция, на долю которой приходится от 9 до 49% внутрибольничных ОКИ [5, 7]. По литературным данным, вспышки ротавирусной инфекции неоднократно регистрировались в соматических стационарах. Осложнения эпидемических ситуаций наблюдались в ЛОР-отделении, хирургических и реанимационных отделениях детских многопрофильных стационарах. Отмечено, что случаи заболевания ротавирусной инфекцией встречались среди 1% детей после нахождения в реанимационном отделении.

Следует отметить, что в немногочисленных научных публикациях определение доли вирусного компонента в общей структуре ОКИ сводится преимущественно к определению процентного соотношения ротавирусной инфекции без учета других возбудителей. Между тем имеются данные о значительной роли норовирусной инфекции как внутрибольничных ОКИ [14]. Применение молекулярно-генетических методов исследования в рамках эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинской организации направлено на выявление всего спектра вирусных возбудителей ОКИ с молекулярно-генетической характеристикой и оценкой их идентичности.

Целью исследования явилось изучение этиологической структуры вирусных ОКИ в условиях неинфекционного многопрофильного детского стационара и молекулярно-генетическая характеристика выявленных кишечных вирусов.

Материалы и методы

В рамках эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями вирусной этиологии в детском многопрофильном стационаре была внедрена сидромальная диагностика случаев ОКИ — выявление и обследование пациентов с признаками дисфункции желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием. Наличие диареи было основным показанием для проведения обследования на различные кишечные инфекции. Обследованию также подвергались лица, выявленные в результате эпидемиологического обследования — контактные с пациентами с указанным синдромом или с подтвержденными диагнозом ОКИ. За 2013 г. было выявлено и обследовано 178 человек, из них 138 детей различного возраста с наличием неинфекционной патологии различных органов и систем, 19 матерей, ухаживающих за детьми, 21 сотрудник. Дети были госпитализированы в эндокринологическое отделение (68%), в отделение раннего возраста (13%), в хирургические (9,9%), в неврологическое (4,4%), в отделение гнойной хирургии

(3,6%), в онкологическое (2,2%), прочие (1,1%). Во время нахождения в стационаре у детей развивалась клиника ОКИ.

С использованием тест-систем для экстракции РНК/ДНК («РИБО-преп»), комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК («РЕВЕРТА-L») и набора для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов («АмплиСенс® ОКИ скрин-FL») производства ЦНИИЭМ (Москва, Россия), проводили поиск РНК ротавирусов группы А, норовирусов, астровирусов, энтеровирусов и ДНК аденовирусов группы F в образцах фекалий (178), мазках из ротоглотки (37), пробах окружающей среды (23). Всего проведено 1850 исследований. Молекулярную диагностику методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли на базе проблемной научной лаборатории ПЦР-исследований НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО НижГМА.

Для генотипирования кишечных вирусов были использованы 132 образца, положительных на наличие возбудителей вирусных ОКИ. Исследования проводили в лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохина Роспотребнадзора.

G[P]-типирование ротавирусов осуществляли методом ОТ-ПЦР с помощью праймеров для идентификации G1, G2, G3, G4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9] типов [6]. Продукты ПЦР детектировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и трис-боратной буферной системе. Результаты регистрировали с помощью видеосистемы для документации гелей «InGenius» (Франция).

Генотипирование кишечных вирусов методом секвенирования проводили путем определения нуклеотидной последовательности фрагментов кДНК, полученных при амплификации типоспецифических участков вирусных геномов размером 365, 349 и 449 нуклеотидов для ротавирусов, норовирусов и астровирусов соответственно [8, 10, 13, 16]. Ампликоны выделяли из геля с применением наборов реагентов производства ООО «Цитокин» и ООО «ФракталБио» (Санкт-Петербург).

Определение первичной структуры фрагментов кДНК осуществляли в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США), согласно рекомендациям производителя. Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК анализировали с применением пакета программ BLAST для идентификации близкородственных штаммов и онлайн-сервиса для автоматического генотипирования норовирусов Norovirus Genotyping Tool Version 1.0.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA, версия 6.1 [17]. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности кишечных вирусов, имеющиеся в базе данных GenBank, номера которых указаны на филогенетических деревьях. Филограммы были построены методом присоединения соседей (Neighbor-Joining) на основе двухпараметрической модели Kimura. Достоверность топологии филограммы оценивали с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных выборок. На филограммах указывали статистические индексы поддержки более 70.

Полученные в данном исследовании последовательности фрагментов генома представлены в международной базе данных GenBank под номерами KP208780, KP208781 (астровирусы), KP208782-KP208785, KR020053 (норовирусы), KR020054 (ротавирусы).

Результаты работы подвергали статистической обработке по общепринятой методике.

Результаты

При обследовании по показаниям 178 человек детского многопрофильного стационара вирусы кишечной группы обнаружены в 43,8±3,7% случаев. Группа, составившая 56,2±3,7%, где вирусные патогены не были обнаружены, подлежала дальнейшему бактериологическому обследованию.

Среди положительных на вирусы кишечной группы лиц (78 человек) моноинфекция выявлена в 72%, в остальных случаях (28%) наблюдалась микст-инфекция двумя вирусами ($p < 0,01$) (рис. 1). В вирусных ассоциациях преобладали ротавирусная+норовирусная инфекции (более 90%). Таким образом, в условиях многопрофильного детского стационара вирусная кишечная инфекция встречалась у каждого второго ребенка, имеющего признаки диареи.

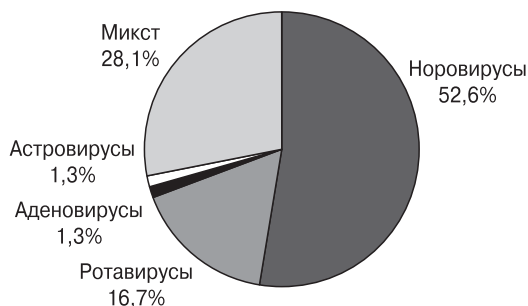


Рисунок 1. Распределение вирусов кишечной группы, обнаруженных у пациентов в многопрофильном стационаре

При анализе по этиологическому признаку выявлено преобладание норовирусной инфекции, на ее долю пришлось 73,2±3,3% обследованных с моноинфекцией ($p < 0,05$). Ротавирусная инфекция занимала второе место и ее удельный вес составлял 23,2±3,2%. Астровирусная и аденовирусная инфекции составляли по 1,8±0,9% случаев.

По результатам эпидемиологической диагностики, среди госпитализированных детей было 9 случаев заноса ОКИ вирусной этиологии, а именно рота- и норовирусных инфекций, 66 случаев носили внутрибольничный характер. Среди матерей, находившихся в стационаре вместе с детьми, отмечено 3 случая — носительство и стертая форма норовирусной инфекции.

В условиях широкого распространения кишечной инфекции проведено исследование объектов окружающей среды одного из отделений стационара на предмет контаминации кишечными вирусами. Были взяты смывы с предметов буфета отделения, палат для пациентов, медицинского поста, санитарной комнаты и туалетов. Наличие кишечных вирусов определено в 47,8±10,4% случаев, то есть каждая вторая проба была положительна. В 39,1±14,7% случаев встречался один вирус, из которых на норовирус приходилось 26,1 и 13,0% на ротавирус. Вирусные ассоциации выявлены в двух случаях. Следует отметить, что положительные результаты на наличие кишечных вирусов были выявлены только в больничных палатах (39,1%) и туалетах (8,7%). Очевидно, что при наличии устойчивости кишечных вирусов в окружающей среде, контаминированные предметы могут явиться одним из постоянно действующих факторов передачи инфекции в условиях стационара, что требует строгого соблюдения санитарно-эпидемиологического режима.

Как известно, основным механизмом передачи кишечных вирусов является фекально-оральный механизм. Однако, учитывая, что в остром периоде заболевания вирусы могут выделяться с носоглоточной слизью и рвотными массами, не исключен аэрогенный механизм передачи. Для подтверждения данного предположения проведено молекулярно-генетическое исследование мазков насо- и ротоглотки от больных острой кишечной инфекцией на наличие кишечных вирусов. В 10,8±5,1% случаев были обнаружены различные кишечные вирусы. Из 4 положительных проб в двух образцах встречался ротавирус, в других — норовирус и аденовирус. Обнаружение генетического материала рота-, норо- и аденовирусов в мазках со слизистых ротоглотки детей с диареей может свидетельствовать о возможности реализации аэрогенного механизма передачи. Однако это требует дальнейших исследований.

На следующем этапе работы на основе установленных нуклеотидных последовательностей фрагментов генома кишечных вирусов осуществляли филогенетический анализ.

Генотипирование 20-ти ротавирусов методами ОТ-ПЦР и секвенирования показало наличие генотипов G4P[8] в шести случаях (30,0%) и G1P[8] — в четырнадцати (70,0%).

Четыре из шести случаев выделения ротавируса G4P[8], зафиксированные в марте-апреле 2013 г. в одном отделении, вероятно, были связаны между собой, и обусловлены заносом инфекции пациентом, имевшим накануне госпитализации повышение температуры до 39°C, дисфункцию желудочно-кишечного тракта (диарею, рвоту) и гиперемию глотки.

Один случай зарегистрирован в июле и один — в октябре 2013 г. Последний также представлял собой занос инфекции, так как больной поступил с температурой и гиперемией глотки, что в совокупности с проявившейся

на следующий день дисфункцией ЖКТ свидетельствовало о начальной стадии заболевания ротавирусным гастроэнтеритом.

В период наблюдения ротавирус генотипа G4P[8] доминировал на территории Нижнего Новгорода при спорадической заболеваемости [8], и его появление у больных стационара было обусловлено, по всей вероятности, неоднократным заносом в стационар.

Ротавирус генотипа G1P[8] был идентифицирован у 14-ти пациентов стационара, госпитализированных в период с июля по декабрь 2013 г. При этом появление кишечной дисфункции у пациентов наблюдалось через 4–10 дней после госпитализации. Как свидетельствует филогенетический анализ, все пациенты были инфицированы одним вариантом ротавируса (рис. 2).

Гомология нуклеотидных последовательностей составила 99,9–100%. Следует отметить, что ротавирусы генотипа G1P[8] в изучаемый

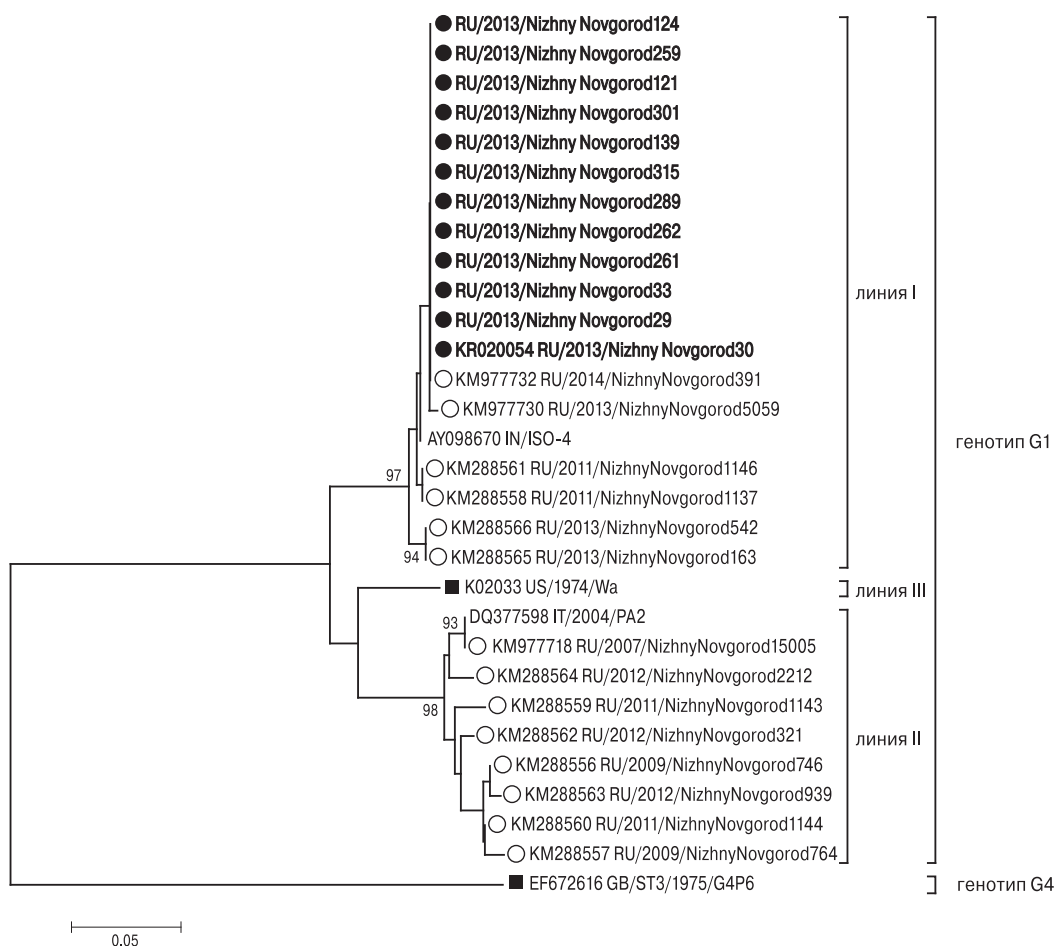


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена VP7 генома ротавирусов

Примечание. Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референсные типовые штаммы ротавирусов генотипов G1 и G4.

период времени в Нижнем Новгороде имели низкую активность циркуляции (доля 12,1%) и были представлены как минимум пятью вариантами [11]. Вариант ротавируса, выявленный у пациентов стационара, по результатам филогенетического анализа отнесен к линии G1-I. Представители данной линии циркулировали в Нижнем Новгороде только в последние годы, в то время как основное место в нижегородской популяции ранее принадлежало вариантам линии G1-II. Представленные результаты свидетельствуют о наличии в многопрофильном стационаре устойчивой циркуляции внут-

рибольничного штамма ротавируса генотипа G1-I и внутрибольничной передачи данного возбудителя.

Генотипирование норовирусов проведено для девяти изолятов. Секвенирование и определение генотипа с помощью онлайн-сервиса показало, что выявленные норовирусы относились к геногруппе GII, генотипам GII.1 (44,4±16,6%), GII.4 (44,4±16,6%) и GII.3 (один изолят).

Норовирус GII.1 был обнаружен в конце марта – начале апреля 2013 г. у четырех пациентов одного отделения (рис. 3). Первый из четырех

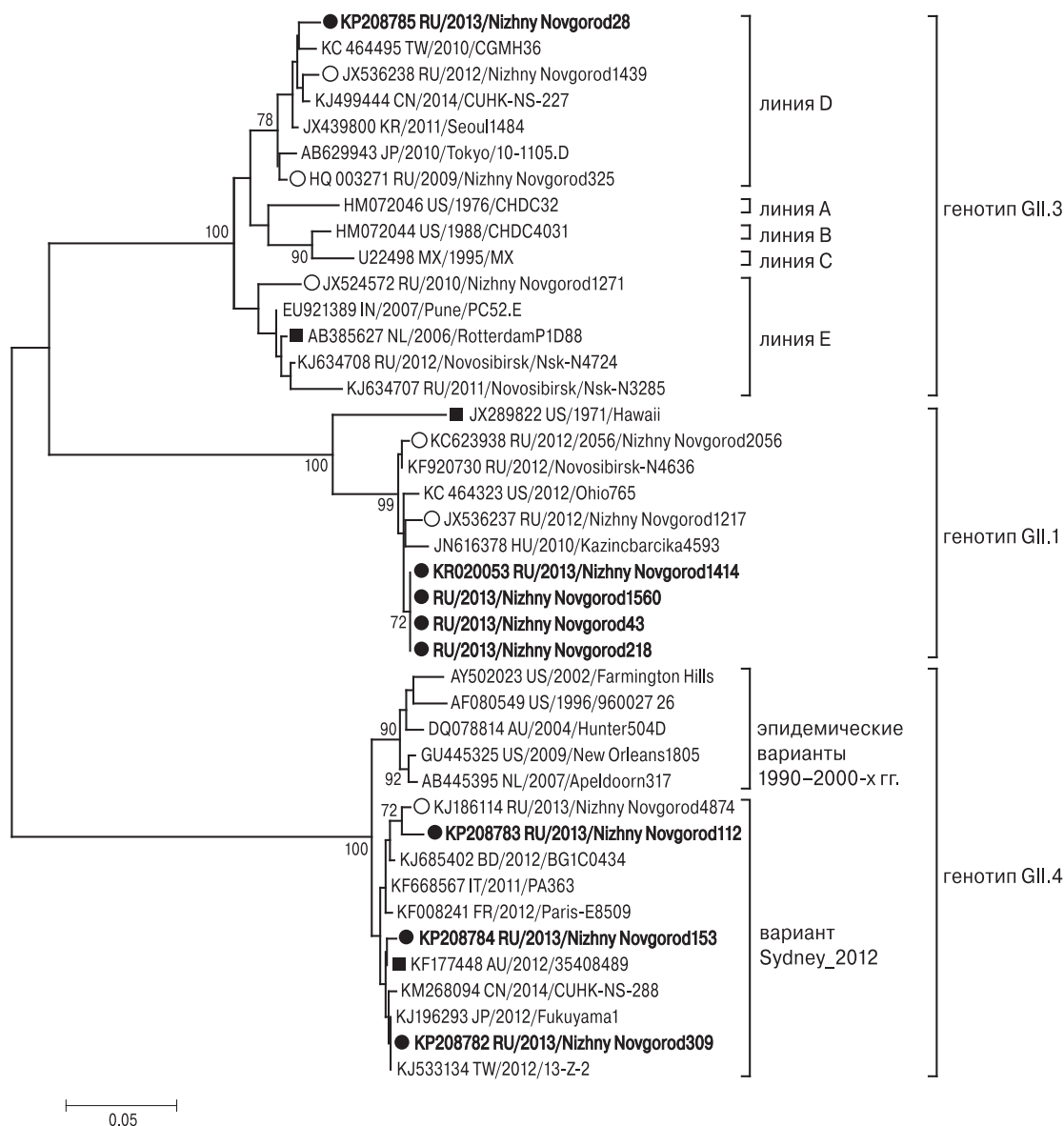


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена VP1 генома норовирусов

Примечание. Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референсные типовые штаммы норовирусов разных генотипов GII.1, GII.3, GII.4.

случаев (1414) документирован как занос инфекции, так как симптомы ОКИ проявились у ребенка, поступившего с повышенной температурой и гиперемией глотки, примерно через 24 часа после госпитализации. Позднее, с интервалом 1–2 недели, от двух детей с ОКИ и от матери без симптомов инфекции, обследованной по контакту с заболевшими, были выделены норовирусы, идентичные изоляту 1414 по исследуемому участку генома (43, 218, 1560). Выявленные норовирусы были сходны с единственным изолятом норовируса генотипа GII.1, обнаруженным за период 2006–2012 гг. при спорадической заболеваемости на территории Нижнего Новгорода (май 2012 г., изолят 1217), а также с норовирусом, вызвавшим вспышку ОКИ в одном из учебных заведений города в сентябре 2012 г. (изолят 2056) (гомология 99,9%) [2].

С учетом единства места и времени выделения норовируса GII.1 в данном исследовании, идентичности полученных нуклеотидных последовательностей, а также факта редкого обнаружения этого генотипа в Нижнем Новгороде, рассматриваемые случаи норовирусной инфекции в стационаре можно считать результатом внутрибольничной передачи инфекции.

Норовирусы GII.4, обнаруженные в ходе данного исследования, относятся к геноварианту *Sydney_2012*, который был впервые обнаружен в Австралии в марте 2012 г. и в эпидсезон 2012–2013 гг. приобрел характер эпидемического варианта, широко распространившись по всему миру [18]. Впервые на территории Нижнего Новгорода он был идентифицирован как этиологический агент группового заболевания ОКИ в соматическом стационаре в ноябре 2013 г.

Все выявленные в данной работе изоляты варианта GII.4 *Sydney_2012*, отличались друг от друга по исследуемому участку генома, последовательности трех из них представлены в филогенетическом дереве (рис. 3). Изолят 112, выявленный в сентябре 2013 г., входит вместе с норовирусом, вызвавшим групповое заболевание ОКИ в Нижнем Новгороде (изолят 4784), в отдельный кластер, сформированный норовирусами, циркулировавшими в ряде европейских и азиатских стран. Изоляты 153 и 309, выделенные в сентябре и декабре 2013 г., сходны с норовирусами, циркулировавшими в Азии.

Дивергенция между выявленными в данном исследовании изолятами норовируса GII.4 *Sydney* составляет 07–2,4%, они отличаются друг от друга на 2–7 нуклеотидных замен. Это с учетом короткого временного интервала между выявлением этих вирусов (сентябрь–декабрь) не позволяет считать, что они произошли от единого предка и представляют собой результат эволюции вируса в процессе внутри-

больничной циркуляции. Более вероятными представляются независимые заносы этих вирусов в стационар.

Последовательность норовируса GII.3 при филогенетическом анализе отнесена к линии D по классификации Mahar [15] (рис. 3). Норовирусы линии D, возникшей в начале 2000-х гг. и линии E, сформировавшейся в середине 2000-х гг., в настоящее время коциркулируют в мире. Представители обеих линий обнаружены в предыдущих исследованиях в Нижнем Новгороде [2]. Изолят 28 наиболее близок к нижегородскому изоляту 1439, и образует с ним, а также с рядом родственных штаммов, выявленных в последние годы в странах Азии, отдельную сублинию в составе линии D.

Астровирусы были обнаружены за период наблюдения у трех больных — у одного в моноинфекции, у двух — в микст-инфекции с ротавирусом и с рота- и норовирусом. Амплифицировать типоспецифический участок генома удалось только для двух изолятов, выделенных в декабре 2013 г. с интервалом в 8 дней в разных отделениях.

На филограмме видно, что 2 выявленных в данном исследовании изолята, принадлежат к разным генотипам (рис. 4). Изолят 315 относится к генотипу 1, линии 1a, сублинии 1a-2010. Известно, что астровирусы первого генотипа являются наиболее распространенными и обладают высоким уровнем генетической гетерогенности, которая выражается в существовании, как минимум, 6 генетических линий [11]. Ранее при исследовании астровирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода, было установлено, что с октября 2010 г. все выявленные астровирусы линии 1a относились к сублинии, которая обозначена 1a-2010 [1]. Изолят 315, выявленный нами в многопрофильном стационаре в 2013 г., был идентичен по исследуемому участку генома ряду изолятов астровирусов, обнаруженным у больных ОКИ в Нижнем Новгороде в 2010–2012 гг., от которых отличался по 1–4 нуклеотидным позициям (гомология 98,8–100%).

Изолят 288 отнесен к генотипу 2, генетической линии 2с, которую недавно было предложено дифференцировать в составе 2-го генотипа, наряду с линиями 2a и 2b [9]. В целом, астровирусы второго генотипа выявляются в мире гораздо реже, чем астровирусы 1-го генотипа. Ранее на территории Нижнего Новгорода было идентифицировано только 2 астровируса 2-го генотипа — в сентябре 2010 г. [1] и в ноябре 2011 г., оба относились к линии 2с. Гомология изолята 288 с выявленными ранее на территории Нижнего Новгорода астровирусами 2-го генотипа составляет 97,2–98,8% (отличия — по 9 и 5 нуклеотидным позициям).

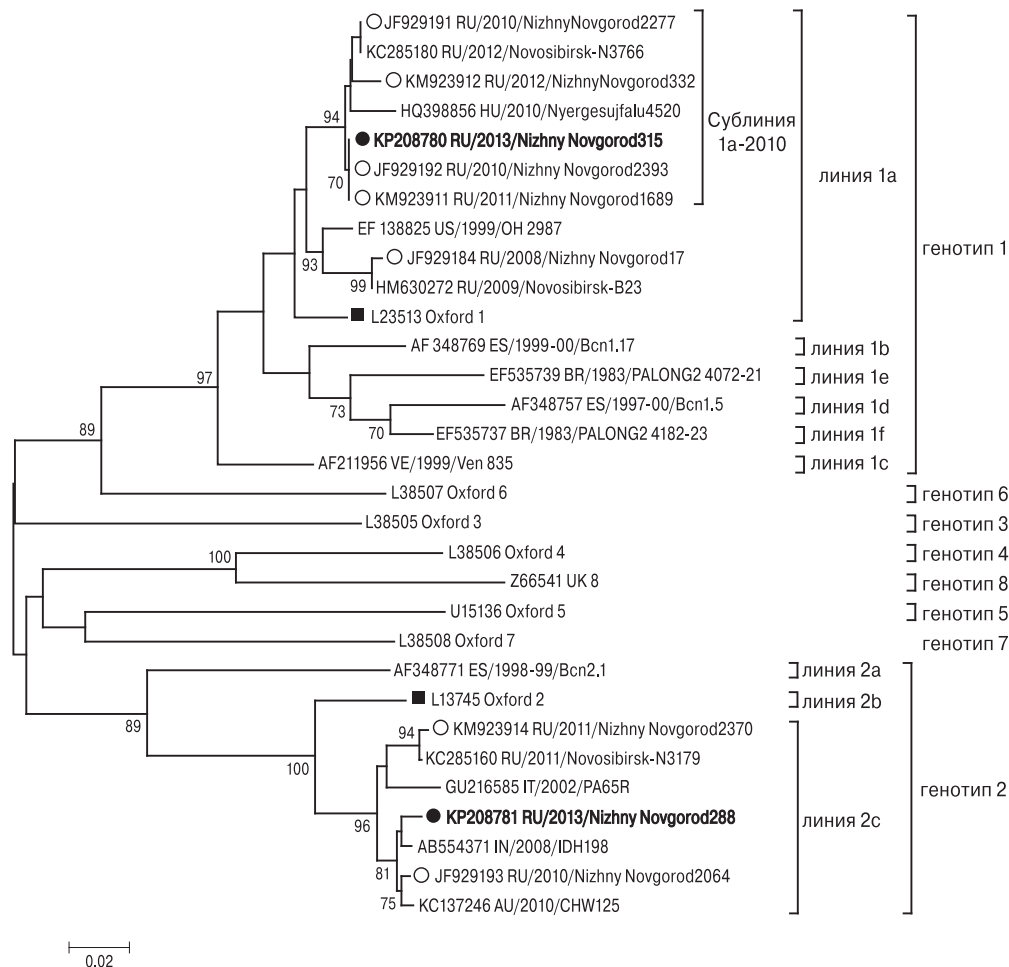


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена предшественника капсидных белков генома астровирусов

Примечание. Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референтные типовые штаммы астровирусов генотипов 1 и 2.

Результаты проведенного генотипирования астровирусов свидетельствуют о том, что эпизоды астровирусной инфекции, выявленные в ходе данного исследования, хотя и произошли с небольшим интервалом времени, не были эпидемиологически связаны друг с другом, а представляли собой результат независимых заносов в стационар извне.

Выводы

Полученные при исследовании результаты свидетельствуют об активной циркуляции кишечных вирусов в условиях многопрофильного детского стационара. Доля ОКИ вирусной этиологии среди пациентов, имеющих клинические признаки кишечной инфекции, и контактных лиц по результатам лабораторных исследований, составила 43,8%. Каждый второй госпитализированный ребёнок с дисфункцией

желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием, был инфицирован кишечным вирусом.

Объекты окружающей среды в неинфекционном отделении были контаминированы вирусами кишечной группы в 47,8% случаев.

Среди выявленных и обследованных лиц доминировали норовирусы геногруппы GI (более 70%). Ротавирусы с преобладанием генотипа G1P[8] занимали второе место (23,2%). Кроме этого, были выявлены аденовирусы группы F и астровирусы генотипов 1 и 2.

Применение молекулярно-генетических методов исследования в комплексе с эпидемиологической диагностикой в рамках эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинской организации позволяет эффективно выявлять весь спектр вирусных возбудителей ОКИ и проводить оценку их идентичности с целью установления внутрибольничной передачи.

Список литературы/References

1. Епифанова Н.В., Новикова Н.А., Ефимов Е.И., Парфенова О.В., Луковникова Л.Б., Фомина С.Г. Молекулярно-генетическая характеристика астровирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 6. С. 32–39. [Epifanova N.V., Novikova N.A., Efimov E.I., Parfenova O.V., Lukovnikova L.B., Fomina S.G. Molecular-genetic characteristic of astroviruses circulating in Nizhny Novgorod. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 6, pp. 32–39. (In Russ.)]
2. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А., Парфенова О.В., Фомина С.Г. Эпидемические варианты норовирусов генотипа GII.4 в Нижнем Новгороде в 2006–2012 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 2. С. 64–72. [Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Novikova N.A., Parfenova O.V., Fomina S.G. Epidemic variants of genotype noroviruses GII.4 in Nizhny Novgorod in 2006–2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 2, pp. 64–72. (In Russ.)]
3. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Зверев В.В., Пономарёва Н.В., Парфёнова О.В., Новиков Д.В., Волкова М.А., Новикова Н.А. Этиологическая структура вирусных кишечных инфекций у детей в Нижнем Новгороде // Медицинский альманах. 2010. № 2 (11). С. 233–236. [Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Golitsyna L.N., Fomina S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Parfenova O.V., Novikov D.V., Volkova M.A., Novikova N.A. Etiological structure of viral intestinal infections in children in Nizhny Novgorod. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2010, no. 2 (11), pp. 233–236. (In Russ.)]
4. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г., Тикунов А., Курильщикова А.М., Соколов С.Н., Нетёсов С.В., Тикунова Н.В. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 4. С. 33–41. [Zhirakovskaia E.V., Aksanova R.Kh., Gorbunova M.G., Tikunov A., Kuril'shchikov A.M., Sokolov S.N., Netesov S.V., Tikunova N.V. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007–2011. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2012, no. 4, pp. 33–41. (In Russ.)]
5. Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Курильщикова А.М., Дёмина А.В., Покровская И.В., Шеронова О.Б., Позднякова Л.Л., Нетёсов С.В., Тикунова Н.В. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у взрослых в Новосибирске // Инфекционные болезни. 2013. Т. 11, № 2. С. 31–37. [Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Yu., Kuril'shchikov A.M., Demina A.V., Pokrovskaya I.V., Sheronova O.B., Pozdnyakova L.L., Netesov S.V., Tikunova N.V. Etiological structure of acute intestinal infections in adults in Novosibirsk. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2013, vol. 11, no. 2, pp. 31–37. (In Russ.)]
6. Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Федорова О.Ф. G[P]-генотипирование ротавирусов с использованием полимеразной цепной реакции: Методические рекомендации. Нижний Новгород, 2007. 16 с. [Novikova N.A., Epifanova N.V., Fedorova O.F. G[P]-genotipirovanie rotavirusov s ispol'zovaniem polimeraznoi tsepnoi reaktsii: Metodicheskie rekomendatsii [G[P]-genotyping of rotaviruses using the polymerase chain reaction: Methodological recommendations]. *Nizhny Novgorod*, 2007. 16 p.]
7. Новокшонов А.А., Соколова Н.В., Сахарова А.А., Бережкова Т.В. Клиническая эффективность нового энтеросорбента в комплексной терапии острых кишечных инфекций вирусной этиологии у детей // Лечащий врач. 2009. № 7. С. 78–80. [Novokshonov A.A., Sokolova N.V., Sakharova A.A., Berezhkova T.V. The clinical efficacy of a new enterosorbent in the treatment of acute intestinal infections of viral etiology in children. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2009, no. 7, pp. 78–80. (In Russ.)]
8. Bull R.A., Tu E.T.V., McIver C.J., Rawlinson W.D., White P.A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 327–333. doi: 10.1128/JCM.44.2.327–333.2006
9. De Grazia S., Platia M.A., Rotolo V., Colomba C., Martella V., Giammanco G.M. Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002–2005: emergence of lineage 2c strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 1, pp. 97–101. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03207.x
10. Di Stefano D.J., Kraiouchkine N., Mallette L., Maliga M., Kulnis G., Keller P.M., Clark H.F., Shaw A.R. Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 12, pp. 5876–5880. doi: 10.1128/JCM.43.12.5876–5880.2005
11. Gabbay Y.B., Leite J.P., Oliveira D.S., Nakamura L.S., Nunes M.R.T., Mascarenhas J., D'Arc P., Heinemann M.B., Linhares A.C. Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982–2000): identification of two possible new lineages. *Virus Res.*, 2007, vol. 129, no. 2, pp. 166–174. doi: 10.1016/j.virusres.2007.07.006
12. Glass R.I., Bresee J., Jiang B., Gentsch J., Ando T., Fankhauser R., Noel J., Parashar U., Rosen B., Monroe S.S. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp.*, 2001, pp. 5–19.
13. Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Fuminori H.B., Takeda N., Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 4, pp. 1548–1557. doi: 10.1128/JCM.41.4.1548–1557.2003
14. Kambhampati A., Koopmans M., Lopman B.A. Burden of norovirus in healthcare facilities and strategies for outbreak control. *J. Hosp. Infect.*, 2015, vol. 89, no. 4, pp. 296–301. doi: 10.1016/j.jhin.2015.01.011
15. Mahar J.E., Bok K., Green K.Y., Kirkwood C.D. The importance of intergenetic recombination in norovirus GII.3 evolution. *J. Virol.*, 2013, no. 87, pp. 3687–3698. doi: 10.1128/JVI.03056-12
16. Noel J.S., Lee T.W., Kurtz J.B., Glass R.I., Monroe S.S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 4, pp. 797–801.

17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, no. 30, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
18. Van Beek J., Ambert-Balay K., Botteldoorn N., Eden J.S., Fonager J., Hewitt J., Iritani N., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., White P.A., Koopmans M., on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance*, 2013, vol. 18, iss. 1, pp. 8–9.

Авторы:

Сергеева А.В., к.м.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, зав. проблемной научной лабораторией ПЦР-исследований НИИ профилактической медицины, ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

Послова Л.Ю., к.м.н., зав. эпидемиологическим отделом ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, г. Нижний Новгород, Россия;

Ковалишена О.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, зам. директора по науке НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

Благонравова А.С., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, директор НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

Епифанова Н.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Сашина Т.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Морозова О.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Sergeeva A.V., PhD (Medicine), Senior Lecturer of the Department of Epidemiology, Head of Problematic Scientific Laboratory PCR-studies, Scientific Research Institute of Preventive Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Poslova L.Yu., PhD (Medicine), Head of Epidemiological Department of the State Budget Hospital Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kovalishena O.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Epidemiology, Deputy Director of Science Scientific Research Institute of Preventive Medicine of the Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Blagonravova A.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Epidemiology, Director of Scientific Research Institute of Preventive Medicine of the Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Epifanova N.V., PhD (Biology), Leading Researcher Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Sashina T.A., Junior Researcher, Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Morozova O.V., Junior Researcher, Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikova N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.05.2015
Отправлена на доработку 10.06.2015
Принята к печати 13.08.2015

Received 20.05.2015
Revision received 10.06.2015
Accepted 13.08.2015