

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В НАДЗОРЕ ЗА ЭНТЕРОВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ. ОПЫТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.Н. Лукашев¹, Л.Н. Голицына², Ю.А. Вакуленко¹, Л.В. Ахмадишина¹,
Н.И. Романенкова³, Е.Ю. Сапега⁴, Н.С. Морозова⁵, Н.А. Новикова²,
О.Е. Троценко⁴, О.Е. Иванова^{6,7}

¹ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

² ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Хабаровск, Россия

⁵ ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁶ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

⁷ Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. Энтеровирусы — мелкие РНК-содержащие вирусы, которые распространены повсеместно и регулярно становятся причиной вспышек заболеваемости с различной симптоматикой. В Российской Федерации с 2006 г. действует надзор за энтеровирусами. За эти годы в России и в мире были отработаны молекулярно-биологические и биоинформатические инструменты для изучения эпидемиологии энтеровирусов. В настоящее время идентификация энтеровирусов в мире осуществляется практически исключительно на основании анализа нуклеотидной последовательности области генома VP1 (около 900 нуклеотидов). При этом в рутинной работе определяется только фрагмент этой области генома (около 300 нуклеотидов). В большинстве случаев этого достаточно, чтобы достоверно типировать вирус, однако точность анализа короткого участка генома ниже, и достоверным критерием типа для короткого фрагмента следует считать 80% сходства нуклеотидной последовательности, а не 75%, как в случае полной области генома VP1. Для даль-

Адрес для переписки:

Лукашев Александр Николаевич
119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, 20/1,
Институт медицинской паразитологии, тропических
и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского.
Тел.: 8 (499) 246-80-49.
E-mail: alexander_lukashev@hotmail.com

Contacts:

Alexander N. Lukashev
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya str., 20/1,
Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical
and Vector-Borne Diseases.
Phone: +7 (499) 246-80-49.
E-mail: alexander_lukashev@hotmail.com

Библиографическое описание:

Лукашев А.Н., Голицына Л.Н., Вакуленко Ю.А., Ахмадишина Л.В., Романенкова Н.И., Сапега Е.Ю., Морозова Н.С., Новикова Н.А., Троценко О.Е., Иванова О.Е. Современные возможности и направления развития молекулярно-эпидемиологического мониторинга в надзоре за энтеровирусными инфекциями. Опыт Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 452–464. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-452-464

Citation:

Lukashev A.N., Golitsina L.N., Vakulenko Y.A., Akhmadishina L.V., Romanenkova N.I., Sapega E.Yu., Morozova N.S., Novikova N.A., Trotsenko O.E., Ivanova O.E. Current possibilities and potential development of molecular enterovirus surveillance. Shared by the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 452–464. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-452-464

нейшего анализа полученных нуклеотидных последовательностей в настоящее время широко применяются Байесовы филогенетические методики, которые позволяют использовать метод молекулярных часов в расследовании вспышек заболеваемости. Энтеровирусы накапливают порядка 0,5–1% нуклеотидных замен в год, поэтому даже короткий фрагмент генома позволяет анализировать филодинамику вирусов на уровне передачи между странами или смены циркулирующего варианта вируса. На более короткой временной шкале короткий фрагмент ограниченно пригоден для изучения молекулярной эпидемиологии, поскольку позволяет достоверно различать не более 1–2 случаев передачи вируса в год. Таким образом, для расследования вспышек желательна определение нуклеотидной последовательности полной области генома VP1 или полногеномной последовательности. В результате анализа имеющихся в базах данных нуклеотидных последовательностей энтеровирусов все более очевидными становятся ограничения, связанные с неравномерной эффективностью надзора в разных странах мира и короткой длиной фрагмента генома, определяемой при рутинном надзоре. Как следствие, полноценный анализ молекулярной эпидемиологии энтеровирусов в глобальном масштабе остается проблематичным. Количество известных нуклеотидных последовательностей энтеровирусов за последние 20 лет выросло в сотни раз, однако понимание закономерностей возникновения вспышек энтеровирусной инфекции практически отсутствует. Эффективное развитие надзора за энтеровирусами потребует внедрения новых методов исследования сточных вод, экономически эффективного высокопроизводительного секвенирования, гармонизации систем надзора в разных странах мира.

Ключевые слова: энтеровирус, менингит, эпидемиология, надзор, филогенетика, эволюция.

CURRENT POSSIBILITIES AND POTENTIAL DEVELOPMENT OF MOLECULAR ENTEROVIRUS SURVEILLANCE. EXPERIENCE OF RUSSIAN FEDERATION

Lukashev A.N.^a, Golitsina L.N.^b, Vakulenko Y.A.^a, Akhmadishina L.V.^a, Romanenkova N.I.^c, Sapega E.Yu.^d, Morozova N.S.^e, Novikova N.A.^b, Trotsenko O.E.^d, Ivanova O.E.^{f,g}

^a *Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

^b *Nizhny Novgorod Science Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. academician I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

^c *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

^d *Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation*

^e *Federal Center of Hygiene and Epidemiology of the Inspectorate for Customers Protection of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation*

^f *Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^g *Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. Enteroviruses are small RNA viruses, which are ubiquitous and commonly cause outbreaks with various clinical manifestations. In 2006, the Program on enterovirus surveillance was approved in the Russian Federation. Over the last years, molecular-biological and bioinformatics methods for enterovirus epidemiology studies have been developed both in Russia and worldwide. Currently, identification of enteroviruses is carried out by analyzing nucleotide sequence of the full-length VP1 genome region (ca. 900 nt). Routinely, it is sufficient to obtain a partial VP1 genome region sequence (ca. 300 bp) for enterovirus verification in most cases; however, a more stringent type criterion of 80% sequence identity should be used compared to the 75% sequence identity cut-off for the complete VP1 genome region. Further sequence analysis may be performed by using Bayesian phylogenetic methods, which allow using molecular clock to trace outbreak emergence. Enteroviruses accumulate about 0.5–1% nucleotide substitutions per year. Therefore, a short genome fragment may be used to analyze virus phylogenetics at the level of international transfers and circulating virus variants. On a shorter timescale, a full-length VP1 genome region or a complete genome sequence are preferred for investigating molecular epidemiology, because a short sequence allows to reliably distinguish not more than 1–2 transmission events per year. Thus, determining enterovirus sequences for full-length VP1 genome region or full-genome sequence is preferred for examining viral outbreaks. It is increasingly apparent that analyzing available enterovirus nucleotide sequences reveals limitations related to uneven surveillance efficacy in various countries and short length of genome fragment measured in routine control. As a result, a proper global-scale analysis of enterovirus molecular epidemiology remains problematic. Over the last 20 years, the number of available enterovirus nucleotide sequences increased by hundred times, but understanding emergence of enterovirus infection outbreaks remains limited. Further development of enterovirus surveillance would require new methods for sewage monitoring, affordable high-throughput sequencing and harmonization of global surveillance systems.

Key words: enterovirus, meningitis, epidemiology, surveillance, phylogenetics, evolution.

Энтеровирусы — мелкие безоболочечные РНК-содержащие вирусы, входящие в семейство *Picornaviridae*, род *Enterovirus*. В соответствии с недавними решениями Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) энтеровирусы подразделяют на 13 видов: Enterovirus A-J и Rhinovirus A-C. У человека выделяют виды Enterovirus A-D и Rhinovirus A-C. Данный обзор посвящен только собственно энтеровирусам человека, то есть видам Enterovirus A-D. Используемое ранее название Human enterovirus более не применяется в связи с тем, что представители видов A-D регулярно обнаруживаются у приматов. Поскольку в последние годы практически все энтеровирусы идентифицируют и относят к известным или новым типам на основании анализа нуклеотидной последовательности, вместо применяемого ранее термина «серотип» рекомендовано использовать термин «тип». На сегодняшний день известно более 120 типов энтеровирусов видов A-D. По современным правилам типы энтеровирусов обозначают с указанием вида, например, «энтеровирус А-71». Исторически некоторые типы называют вирусами Коксаки А и В (например, KB-A2/CV-A2 и KB-B3/CV-B3) и вирусами ЕСНО (например, E11).

Энтеровирусы распространены повсеместно. Энтеровирусная инфекция (ЭВИ) может протекать бессимптомно, о чем свидетельствует регулярное выделение энтеровирусов от здоровых лиц. В зависимости от страны и времени года частота выявления энтеровирусов в фекалиях здоровых детей может достигать 20% [18, 35, 39]. В случае развития клинической ЭВИ чаще всего наблюдается легкое фебрильное (простудоподобное) заболевание без ярко выраженной специфической симптоматики, в связи с чем большинство таких случаев лечится амбулаторно, не диагностируется и не регистрируется как ЭВИ. Обычно госпитализируют больных с экзантемными формами ЭВИ (чаще всего везикулярный дерматит), герпетической ангиной (везикулярный тонзиллит или фарингит), серозным менингитом. В странах умеренного климата энтеровирусы являются основной причиной вирусного менингита. В редких случаях энтеровирусы могут вызывать менингоэнцефалит, тяжелые поражения сердца и легких, мультисистемную инфекцию новорожденных, клинически сходную с сепсисом. ЭВИ может проявляться в виде спорадических случаев и вспышек, но периодически на отдельных территориях формируются эпидемические подъемы заболеваемости.

Энтеровирусы являются важным источником возникающих заболеваний. В конце XIX в. началась пандемия паралитического полиомиелита. В 1970 г. имела место пандемия геморрагического конъюнктивита, вызванного энтеровирусом 70 типа [32, 40]. В 1980-е гг. в РФ произошли крупные вспышки энтеровирусного увеита,

вызванного E11 и E19 [2]. Начиная с конца XX в. в Восточной и Юго-Восточной Азии продолжается пандемия вызванного EV-A71 везикулярного дерматита, который у некоторых больных протекает с неврологическими осложнениями (менингоэнцефалит) [23]. В настоящее время в России регулярно происходят вспышки серозного менингита, чаще всего вызываемого E30. Начиная с 2010 г. в мире распространяются атипичные формы инфекции CV-A6, протекающие с необычными кожными проявлениями [33].

С 2008 г. в Российской Федерации реализуется программа «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции». После сертификации в 2002 г. Российской Федерации как страны, свободной от полиомиелита [9], надзор за циркуляцией энтеровирусов рассматривается как важная дополнительная составляющая надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами. Рост заболеваемости ЭВИ в отдельных субъектах и в целом по РФ, наличие сезонных подъемов заболеваемости, регистрация эпидемических очагов с групповыми случаями заболеваний, высокий риск завоза высоковирулентных штаммов определяют самостоятельную актуальность надзора за энтеровирусами для Российской Федерации.

В настоящее время надзор за энтеровирусной инфекцией представляет собой непрерывное наблюдение за эпидемическим процессом с целью оценки ситуации, своевременного принятия управленческих решений, разработки и реализации санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, обеспечивающих снижение рисков распространения ЭВИ, предупреждения тяжелых форм ЭВИ и формирования очагов с множественными случаями заболеваний. Неотъемлемыми составляющими эффективного надзора являются точная идентификация энтеровирусов и информативные молекулярно-эпидемиологические исследования.

Первичная диагностика энтеровирусов у больных и в объектах внешней среды проводится на местах на базе лабораторий медицинских учреждений и ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ», преимущественно методом ПЦР.

Классическим и пока еще достаточно широко применяемым методом идентификации энтеровирусов в вирусологических лабораториях РФ является определение серотипа вируса в реакции нейтрализации с помощью типоспецифических диагностических сывороток. Главные недостатки этого метода — низкая цитопатогенность некоторых типов и недостаточная специфичность, приводящая к ошибочной идентификации типа вируса. Проблема специфичности практически не актуальна для сывороток, изготовленных в США и в Голландии, однако на сегодняшний день их производство прекращено. Молекулярная идентификация (определение нуклеотидной последовательности)

ти фрагмента генома, кодирующего структурные белки) позволяет определить тип и подтип (генотип) как при исследовании клинических образцов, так и вирусов, выделенных в культуре клеток. Молекулярная идентификация применяется все чаще, однако в полной мере доступна только нескольким специализированным центрам, на базе которых ежегодно в целом по РФ исследуется около 2000–2500 вирусосодержащих образцов. На первом этапе формирования системы молекулярно-генетического мониторинга энтеровирусов происходила отработка методик и накопление первичных данных. В данном обзоре рассмотрены основные методические подходы, применяемые при анализе генетической информации энтеровирусов, их возможности, ограничения и перспективы развития.

По итогам десятилетнего молекулярного мониторинга только в референс-центре по мониторингу энтеровирусных инфекций (Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной) было типировано около 3500 штаммов энтеровирусов. Идентифицировано 52 типа неполиомиелитных ЭВ: вирусы вида Энтеровирус А: Коксаки А2–6, 8, 10, 14, 16, EV-A71, EV-A76, EV-A120; вирусы вида Энтеровирус В: Коксаки А9, Коксаки В1–5, ЕСНО 1–7, 9, 11, 13–19, 21, 25, 29, 30, 31, 33, ЭВВ75; вирусы вида Энтеровирус С: Коксаки А1, 13, 17, 19, 20, 21, 22, 24, EV-C99, EV-C113, ЭВС116. Ежегодно выявлялось около 30-ти типов неполиомиелитных ЭВ, при этом многие типы энтеровирусов характеризовались наличием нескольких одновременно циркулирующих генотипов. Установлены этиологические агенты 161 группового заболевания ЭВИ [1].

На основе данных, опубликованных в 1999 г. [30], Международный комитет по таксономии вирусов определяет тип энтеровируса на основании сходства с другими вирусами типа более чем на 75% нуклеотидной и 85% аминокислотной последовательности в полной области генома VP1 (около 900 нуклеотидов, от 840 до 930 у разных типов). Благодаря тому, что рекомбинация в области генома, кодирующей структурные белки VP1, VP2 и VP3 (но не VP4) встречается редко [4, 20, 21], любой из этих участков генома может быть использован для типирования энтеровирусов [5, 27], однако точные критерии типа будут несколько отличаться из-за разной вариабельности этих участков генома. На практике молекулярное типирование энтеровирусов в большинстве лабораторий мира и в РФ проводят на основании фрагмента области генома VP1 длиной около 370 нуклеотидов (так называемый «типировующий» фрагмент), который может быть амплифицирован с использованием универсальных праймеров [29]. Для этого фрагмента генома в базе данных GenBank доступно более 30 000 нуклеотидных последовательностей. Использование других структурных белков, например, VP2, затрудняет

последующий анализ из-за небольшого количества последовательностей этих участков генома в базе данных GenBank (около 4000) и с неравномерным распределением по типам. Определение типа удобно производить на основании сравнения выявленной нуклеотидной последовательности с базой данных GenBank при помощи поискового алгоритма BLAST. При использовании такого подхода необходимо, чтобы перекрытие типизируемой последовательности с последовательностями из GenBank (Query coverage) было не менее 90%. Только в таком случае возможно интерпретировать результат. При использовании для типирования программ для филогенетического анализа необходимо использовать нескорректированные дистанции (p-distance). Использование любой коррекции или модели замен, которые применяются, например, для филогенетического анализа (модели Jukes-Cantor, Kimura, GTR и т.п.) делает невозможным применение указанных критериев.

На сегодняшний день нет четкого критерия типа для этого короткого фрагмента VP1, поскольку вариабельность в полной и частичной области VP1 может несколько различаться. Для определения такого критерия мы построили распределение попарных нуклеотидных дистанций в полной области генома VP1 и в области типизирующего фрагмента для 34 наиболее распространенных типов энтеровирусов (рис. 1А, Б; рис. 2А, Б). В полной области генома VP1 внутритиповые сходства нуклеотидных последовательностей находятся в пределах 72–100% (рис. 1В), а аминокислотных — в пределах 84–100% (рис. 2В). Более 99% попарных сравнений находятся в пределах предложенных 20 лет назад критериев типа — более 85% сходства аминокислотной и более 75% нуклеотидной последовательности [30]. Таким образом, за последние 20 лет данные значения практически не изменились, несмотря на приблизительно 100-кратное увеличение числа доступных последовательностей энтеровирусов и постоянное накопление мутаций [22]. В типизирующем фрагменте наблюдается сходная картина, однако граница между дистанциями внутри и между типами не такая выраженная (рис. 1Б, Г; рис. 2Б, Г). Из почти что 7 млн проанализированных попарных различий энтеровирусов в типизирующем фрагменте значения сходств при внутритиповых сравнениях были не ниже 72% для нуклеотидных и 84% аминокислотных последовательностей вирусов одного типа (рис. 1Г, рис. 2Г). Однако межтиповые сходства между короткими фрагментами VP1 разных типов достигали 78 и 89% для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соответственно, то есть между 72–78% сходства нуклеотидной и 84–89% аминокислотной последовательности существует «серая зона» значений, в которой достоверное определение типа невозможно. Таким образом, при использовании короткого типизирующего фрагмента сходство более 80% нуклеотидной и более 90% аминокислот-

ной последовательности с известными вирусами позволяет уверенно определить тип образца. В спорных случаях, например, для некоторых типов вида Энтеновирус С [8], в случае верификации открытия ЭВ нового типа или обнаружения нового генотипа известного типа, рекомендовано определение полной нуклеотидной последовательности области генома VP1, причем желательнее рассматривать сходство как нуклеотидной, так

и аминокислотной последовательности. В случае попадания попарных сходств между полными последовательностями VP1 предположительно нового типа вируса в «серую зону» (72–75% для полной нуклеотидной последовательности VP1 и 84–87% для аминокислотной последовательности) желательнее экспериментальное подтверждение принадлежности вируса к новому типу с помощью серологических методов.

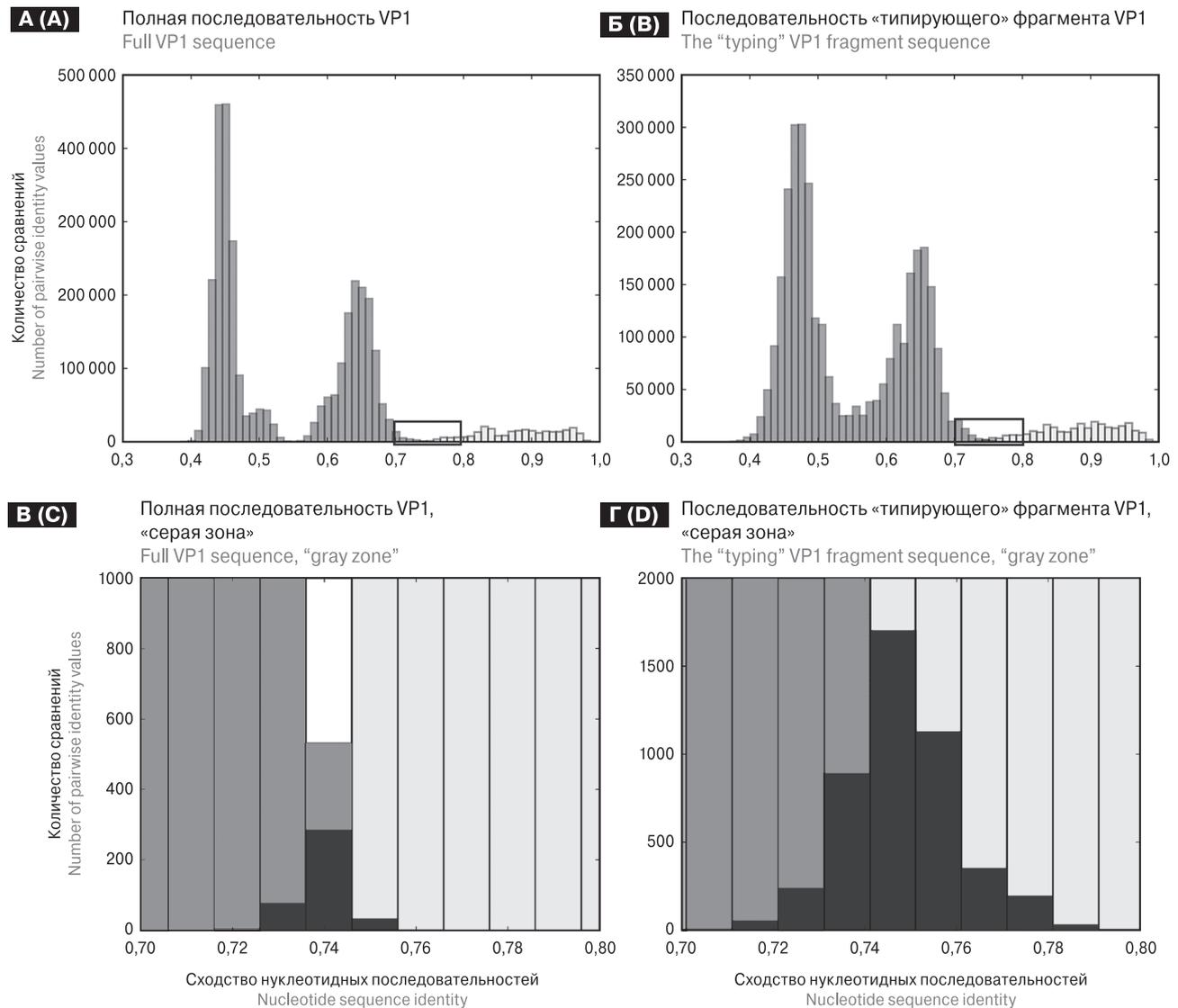


Рисунок 1. Гистограммы распределений значений попарных сходств между нуклеотидными последовательностями полных (А, В) и коротких (Б, Г) участков VP1 для 34 наиболее распространенных типов энтеровирусов

Figure 1. Distribution of pairwise identity values between nucleotide sequences of full-length (A, C) and short (B, D) VP1 fragments derived from most common 34 types of enteroviruses

Примечание. Рисунки В и Г являются фрагментами рисунков А и Б соответственно в области границы межтипичных и внутритипичных сравнений. Темно-серым и светло-серым цветом показаны значения межтипичного и внутритипичного попарного сходства соответственно. На рисунках В и Г черным цветом показаны перекрывающиеся значения сходств, которые находятся в «серой зоне». Матрицы попарного сходства между 2615 последовательностями энтеровирусов были рассчитаны в программе MEGA6 [37].

Note. Panels C and D represent magnified fragments of panels A and B, respectively, within the range of Intertypic and intratypic comparisons. Intertypic and intratypic similarity values are shown in dark-gray and light-gray, respectively. Panels C and D highlight in black the overlapping values presented in "gray zone". Matrices of pairwise similarity values among 2615 sequences were calculated by using MEGA6 software [37].

Важным преимуществом молекулярного типирования является возможность проведения филогенетического анализа полученных вирусов. В случае энтеровирусов одного типа для анализа используется нуклеотидная, а не аминокислотная последовательность, поскольку нуклеотидные замены накапливаются приблизительно в 10 раз быстрее. Филогенетический анализ помогает выявить источники заноса вируса и пути распространения, проследить развитие вспышки или

эпидемии. Простота получения и анализа нуклеотидных последовательностей позволяют проводить такой анализ пользователям с минимальной квалификацией, причем методы не содержат механизмов контроля качества полученных последовательностей, а критерии достоверности оценивают значимость филогенетических взаимоотношений, но не их последующей интерпретации. Ниже мы рассмотрим основные ограничения для филогенетического анализа энтеровирусов.

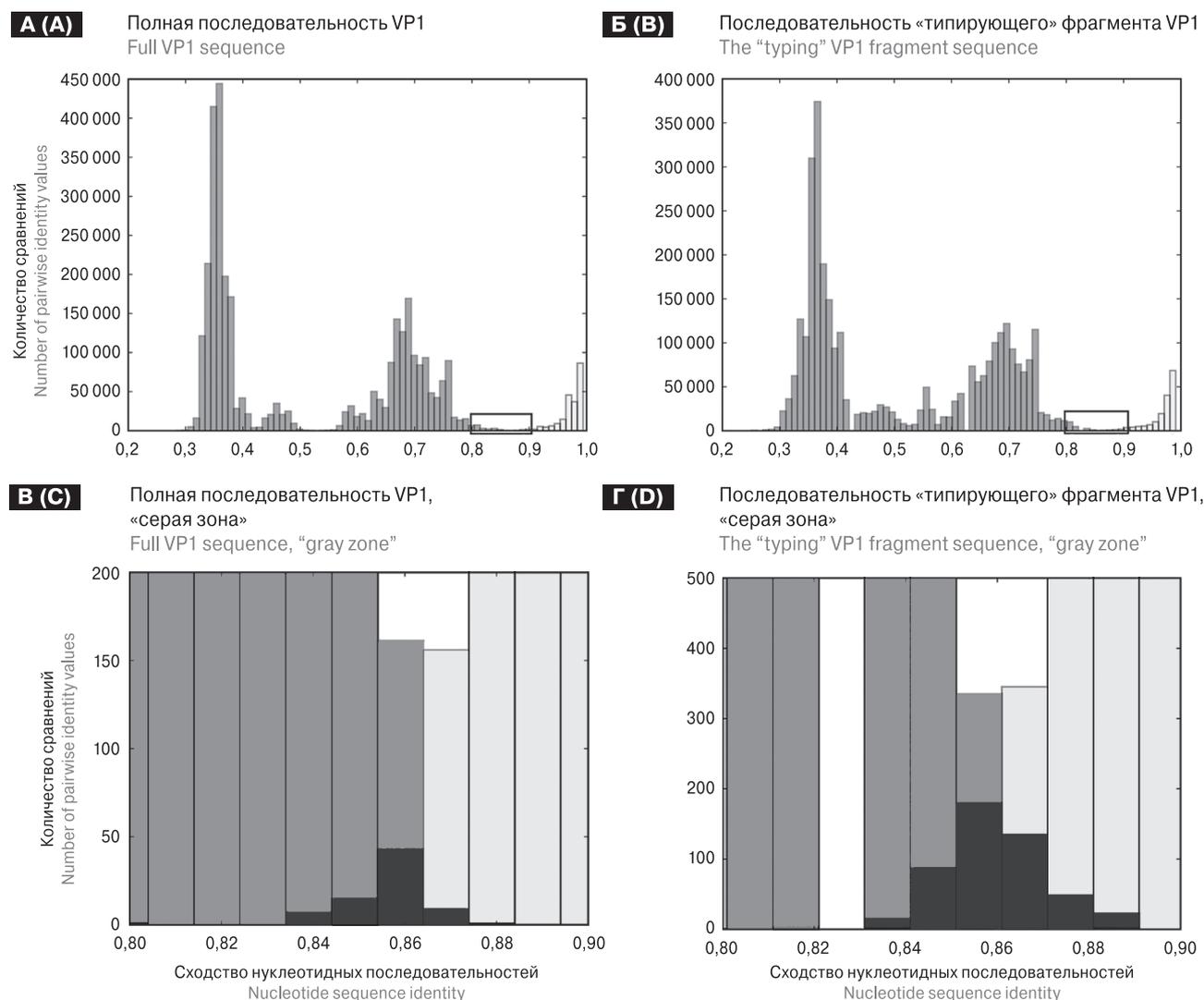


Рисунок 2. Гистограммы распределений значений попарных сходств между аминокислотными последовательностями полных (А, В) и коротких (Б, Г) участков VP1 для 34 наиболее распространенных типов энтеровирусов

Figure 2. Distribution of pairwise identity values between amino acid sequences of full-length (A, C) and short (B, D) VP1 fragments derived from most common 34 types of enteroviruses

Примечание. Рисунки В и Г являются фрагментами рисунков А и Б соответственно в области границы межтипových и внутритипových сравнений. Темно-серым и светло-серым цветом показаны значения межтипového и внутритипového попарного сходства соответственно. На рисунках В и Г черным цветом показаны перекрывающиеся значения сходств, которые находятся в «серой зоне». Матрицы попарного сходства между 2615 последовательностями энтеровирусов были рассчитаны в программе MEGA6 [37].

Note. Panels C and D represent magnified fragments of panels A and B, respectively, within the range of Intertypic and intratypic comparisons. Intertypic and intratypic similarity values are shown in dark-gray and light-gray, respectively. Panels C and D highlight in black the overlapping values presented in «gray zone». Matrices of pairwise similarity values among 2615 sequences were calculated by using MEGA6 software [37].

На сегодняшний день (май 2018 г.) в базе данных GenBank представлено около 53 500 нуклеотидных последовательностей энтеровирусов А-D. Около 39 000 из них относятся к области генома VP1. Распределение известных нуклеотидных последовательностей по времени и месту выделения крайне неравномерное. Большая часть вирусов была выделена после 2000 г. (рис. 3) в Китае, Франции, Японии, США, Индии, Нидерландах, РФ — странах, которые проводят активный надзор за энтеровирусами (табл. 1).

При этом даже в пределах указанных стран существуют значительные различия между представленными типами и годами выделения. Для многих типов филогенетический анализ неинформативен из-за крайне неоднородной выборки доступных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей. Например, 33 из 35 известных последовательностей EV-B85 были выделены в Китае в 2011 г.

На сегодняшний день в большинстве стран депонирование последовательностей вирусов при рутинном надзоре не практикуется, и доступны в первую очередь массивы данных для отдельных типов, полученные в результате научных исследований. Более того, количество последовательностей не в полной мере отражает их информативность, так как возможно депонирование большого количества практически идентичных последовательностей, полученных, например, во время расследования крупных вспышек заболеваемости. Таким образом, при сравнении полученной последовательности можно определить ее сходство только с известными вирусами. Это объясняет, почему в литературе часто обсуждаются заносы энтеровирусов из Европы и Китая, но не из других стран, в которых не ведется систематического секвенирования энтеровирусов и депонирования данных в базу данных GenBank. Точно так же выводы

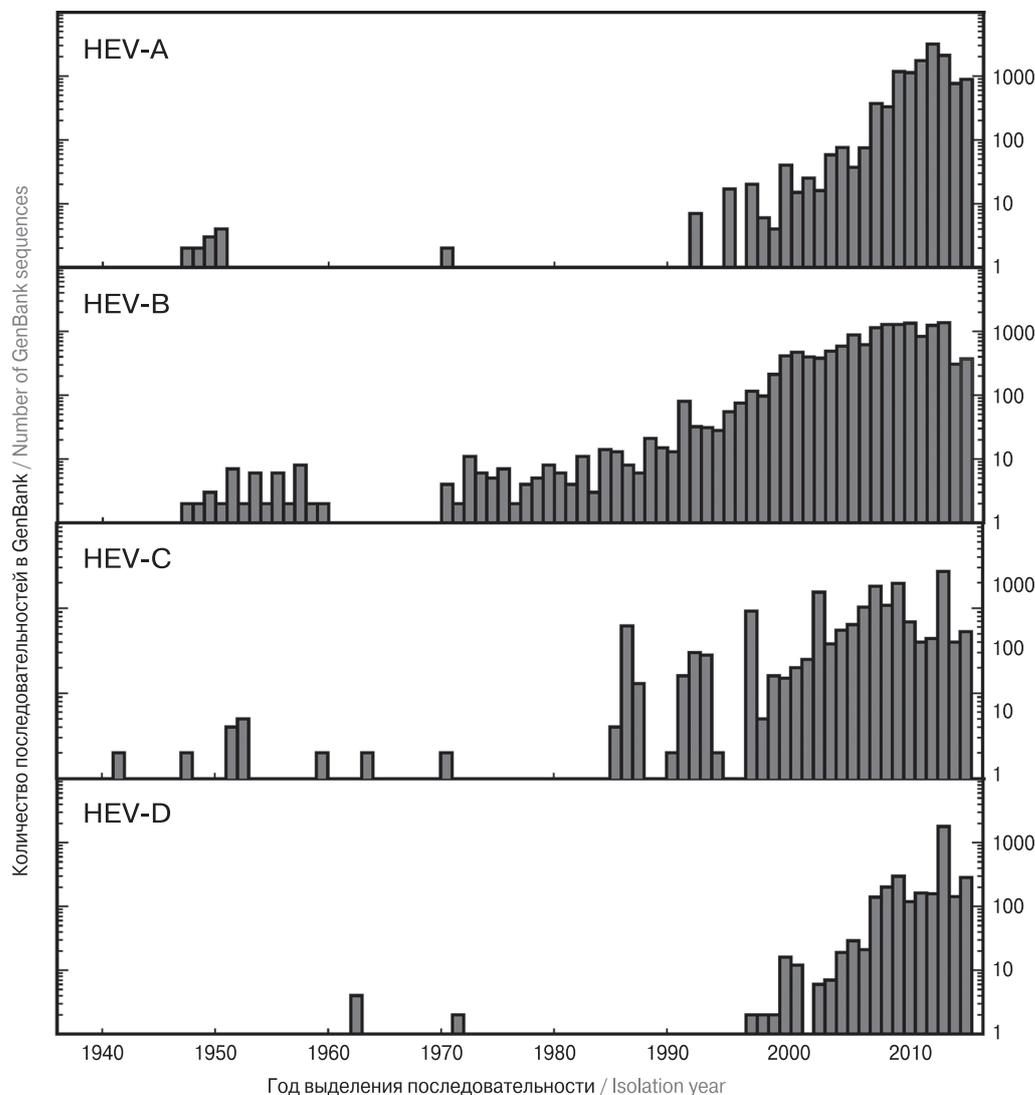


Рисунок 3. Количество депонированных в базе данных GenBank последовательностей энтеровирусов, выделенных в разные годы, с 1940 по 2017 гг. [22]

Figure 3. The number of enterovirus sequences isolated within 1940–2017 deposited in the GenBank [22]

о формировании в странах с высокой плотностью надзора эндемичных штаммов, которые не выявлялись в других странах, могут быть связаны с неравномерностью надзора в мире, а не с истинной эпидемиологией вирусов.

Для наиболее распространенных типов энтеровирусов количество известных нуклеотидных последовательностей исчисляется сотнями или тысячами. Филогенетический анализ сразу всех известных сиквентов в таком случае будет и затруднен технически и ограниченно информативен. Выбор референсных сиквентов для филогенетического анализа имеет ключевое значение для получения максимально достоверных результатов. При ручном выборе референсных последовательностей существует риск серьезного искажения результатов. Оптимальным подходом может быть исключение из анализа слишком сходных референсных последовательностей, причем критерии для исключения могут быть разными для различных групп вирусов. Например, при расследовании вспышки целесообразно включать все последовательности, близкие к выделенному во время вспышки вирусу, а для более отличных вирусов (например, отличающихся от исследуемого изолята более чем на 5%) исключить «повторные» последовательности, которые отличаются друг от друга менее чем на 2–5%. Каких-либо универсальных стандартов и алгоритмов подбора референсных нуклеотидных последовательностей для анализа не существует, хотя именно этот этап анализа является определяющим для его достоверности. На сегодняшний день подготовка репрезентативного набора сиквентов для сравнения является более сложной задачей (как технически, так и с точки зрения эпидемиологии и эволюции), нежели собственно филогенетический анализ.

Качество депонированных в GenBank данных в целом высокое, однако встречаются последовательности (менее 1%) с очевидными ошибками секвенирования или аннотации (даты, места выделения, типа). Исключение таких последовательностей является важным этапом для дальнейшего анализа, особенно с использованием Байесовых филогенетических методов, поскольку даже несколько ошибочных последовательностей могут значительно исказить все результаты расчетов. Признаками ошибочных последовательностей являются несоответствие соотношения процента синонимических и несинонимических замен наблюдаемому в среднем в VP1, группы последовательных аминокислотных замен в относительно консервативных участках генома, непропорционально длинные ветви на филогенетическом дереве, скорость накопления замен (rate) на отдельных ветвях дерева, значительно отличающаяся от средней для данного филогенетического дерева и для VP1 в среднем (6×10^{-3} — 12×10^{-3} замен на сайт в год, табл. 2).

Таблица 1. Количество доступных в базе данных GenBank последовательностей неполиомиелитных энтеровирусов, выделенных в разных странах

Table 1. Number of non-polio enterovirus sequences isolated in various countries available in the GenBank database

Страна Country	Число последовательностей в базе данных GenBank The number of GenBank entries
Китай China	16 525 (+2506 — Тайвань/Taiwan)
Франция France	2795
Япония Japan	2777
Индия India	2069
Нидерланды Netherlands	1987
Таиланд Thailand	1758
Россия Russia	1679
США USA	1468
Прочие страны либо страна не указана Other countries	20 606

Благодаря достаточно высокой и предсказуемой скорости накопления нуклеотидных замен у энтеровирусов даже на основании процента сходства нуклеотидной последовательности можно выполнить грубую оценку источника и времени происхождения вируса. Следует принимать во внимание, что скорость накопления замен может различаться в 1,5–2 раза между разными генотипами одного типа [25]. Кроме того, после того как два вируса имели общего предка, накапливали замены оба, то есть процент замен между вирусами отражает суммарное время от общего предка до каждого из вирусов. Например, если два вируса, выделенные в 2010 г., различаются на 4% нуклеотидной последовательности в области генома VP1, то их общий предок скорее всего существовал в 2007–2008 гг. (при скорости накопления замен каждым вирусом 0,6 или 1% в год соответственно).

Удобным подходом для быстрой оценки молекулярной эпидемиологии энтеровирусов является определение генотипов внутри типа. Для наиболее распространенных типов, таких как E11 [31], E30 [7], EV-A71 [23], существуют устоявшиеся системы генотипов. Использование генотипов значительно облегчает описание результатов и взаимодействие между исследователями. У некоторых типов, например, E11, EV-A71, генотипы четко отделены друг от друга на филогенетическом дереве, хотя определять генотип

Таблица 2. Скорости замен для наиболее распространенных типов [22]

Table 2. Nucleotide substitution rates for the most common enterovirus strains [22]

Тип Serotype	Скорость замен, $\times 10^{-3}$ замен/ сайт/год Substitution rate, $\times 10^{-3}$ substitutions/ site/year	95% доверительный интервал, $\times 10^{-3}$ замен/ сайт/год 95% confidence interval, $\times 10^{-3}$ substitutions/ site/year
CV-A6	9,0	7,2–11,2
CV-A10	8,3	6,3–10,3
CV-A16	8,2	6,6–9,9
CV-A20	4,1	2,2–6,1
CV-B1	9,1	7,0–11,3
CV-B3	6,8	5,5–8,0
CV-B4	6,7	5,5–8,0
CV-B5	7,7	6,6–8,9
E-11	6,5	5,4–7,7
E-1	2,2	8,4–16,3
E-30	7,5	6,4–8,6
E-6	9,6	7,9–11,1
E-9 [26]	5,8	3,7–8,1
EV-A71	6,0	5,5–6,5

только на основании степени отличия нуклеотидной последовательности не всегда возможно. У E30, напротив, определение генотипов в ряде случаев, особенно для архивных штаммов, носит субъективный характер [7]. Универсальных критериев генотипа не существует. У приблизительно половины типов существуют четко ограниченные филогенетические подгруппы. Для таких типов характерно мультимодальное распределение внутритиповых значений попарных сходств (различий) со множеством пиков, что позволяет определить критерий генотипа, однако у различных типов эти критерии будут разными, в пределах 12–20% различия нуклеотидной последовательности области генома VP1 [22]. У другой части типов не наблюдается мультимодального распределения попарных дистанций внутри типа. В этих случаях невозможно определить количественные критерии генотипов в виде фиксированного процента сходства/различия нуклеотидной последовательности, однако возможно определение генотипов на основе филогенетического группирования для облегчения обсуждения результатов.

Для более точной оценки филодинамики энтеровирусов в настоящее время широко используют Байесовы филогенетические методы [11], которые стали доступны только в 2007 г. В случае достаточно большого объема исходных данных метод является вполне воспроизводимым и позволяет получить ответ о времени существования последнего общего предка вирусов с учетом 95% доверительного интервала. Например, расследование вспышки менингоэнцефалита,

вызванного ЭВ71 в Ростове-на-Дону в 2013 г., выявило, что вирус, скорее всего, был занесен на территорию РФ из Китая за 3 года до вспышки и затем циркулировал в РФ, не вызывая значимых вспышек заболеваемости [6]. За эти три года нет свидетельств передачи этой линии вируса из Китая, однако, поскольку количество сиквенсов из большинства стран Азии остается недостаточным, не исключено, что этот вирус циркулировал не только в РФ, но и «где угодно, кроме Китая и Европы».

Байесовы филогенетические методы также позволяют исследовать филогеографию вирусов [17]. В этом случае метод Монте-Карло с Марковскими цепями используется для оптимизации расчета филогенетических взаимоотношений геномных последовательностей во времени и в пространстве. Расчет филогеографии хорошо работает для зоонозов, таких как бешенство [17]. В случае энтеровирусов его применение в значительной степени ограничено лимитом филогенетического разрешения.

Теоретическая возможность различить 2 штамма и достоверно оценить их филогенетические взаимоотношения определяется скоростью накопления замен и длиной известной нуклеотидной последовательности. При скорости накопления замен 0,6–1,2% в год в участке генома длиной 300 нуклеотидов можно ожидать появление 2–4 замен за год. Таким образом, анализ «типизирующего» фрагмента VP1 теоретически позволяет выявить не более 2–4 эволюционных событий в год. Этого достаточно для оценки циркуляции вирусов в масштабах страны, но недостаточно для расследования филодинамики вирусов, например, внутри вспышки. Даже полная последовательность области генома VP1 (около 900 нт) теоретически позволяет определять не более 5–15 событий в год и в целом подходит только для расследования крупных вспышек, например, вспышки полиомиелита в Таджикистане в 2010 г. [41]. Учитывая то, что длительность одного цикла энтеровирусной инфекции составляет порядка 3–10 дней, для достоверного расследования распространения вируса во время вспышек может быть рекомендовано определение полной нуклеотидной последовательности. На сегодняшний день в системе надзора за энтеровирусами в РФ таких работ на регулярной основе не ведется.

Проблема разрешения филогенетических методов неотъемлемо связана с вопросом необходимой плотности молекулярно-генетического надзора за энтеровирусами. Анализ филогенетических последовательностей позволяет оценить адекватность существующей системы надзора. Целью молекулярно-эпидемиологического надзора можно считать полноценное представление обо всех вариантах энтеровирусов, циркулирующих на территории, и путях их распространения. Частота обнаружения разных типов различается в сотни раз и в РФ (<http://www.nniiem>).

ru/development/informanalit/evi.html), и в других странах [15, 38]. Более того, внутри типов возможно существование редких вариантов вирусов, которые в течение десятилетий не выявлялись даже при достаточно интенсивном надзоре [42]. С точки зрения выявления новых вариантов вирусов, плотность действующего надзора все еще нельзя признать адекватной. Этот показатель можно будет считать достигнутым, когда любой редкий генотип, присутствующий на территории РФ, будет представлен как минимум десятью образцами. На сегодняшний день определение большого количества нуклеотидных последовательностей практически идентичных вирусов нецелесообразно экономически, поскольку минимальную стоимость типирования одного вируса, без учета трудозатрат и накладных расходов, можно оценить в 3000 рублей.

Целью профилактических мероприятий, разработанных на основе данных эпидемиологического надзора за ЭВИ, является снижение рисков формирования и распространения очагов с множественными случаями заболеваний. Эта цель является, вероятно, наиболее труднодостижимой. Прогнозирование в настоящее время опирается на анализ ретроспективной заболеваемости. Очевидно, что прогнозирование должно базироваться на анализе множественных факторов, таких как заболеваемость в предшествующие периоды, данные молекулярно-эпидемиологического мониторинга, показатели коллективного иммунитета.

На сегодняшний день в мире опубликовано достаточно большое количество работ, посвященных возможным причинам и механизмам возникновения вспышек и эпидемий энтеровирусной инфекции, однако целостного понимания этого процесса на сегодняшний день нет. К числу факторов, которые могут быть ассоциированы с возникновением вспышек энтеровирусной инфекции, относят колебание уровня коллективного иммунитета, климатические и социальные факторы. Изменение активности циркуляции вируса, связанное с сезонностью энтеровирусной инфекции (в РФ подъем заболеваемости с пиком в июле–сентябре) может способствовать возникновению и исчезновению из циркуляции новых вариантов энтеровирусов. Показано, что этот процесс происходит даже в пределах одного типа. Например, рекомбинантные формы E30 регулярно появлялись, получали широкое распространение в течение одного или нескольких сезонов и самопроизвольно исчезали из циркуляции в Европе [24]. В целом можно сказать, что случайные факторы могут иметь не меньшее значение для эпидемиологии вируса, чем коллективный иммунитет.

Роль генетических характеристик вируса в возникновении вспышек заболеваемости остается неясной. Во время эпидемии везикулярной экзантемы в Китае в 2008–2011 гг. EV-A71 был

основным циркулирующим вирусом, но более чем в половине случаев от больных с экзантемой выделяли CV-A16 и другие типы [19]. В других странах Юго-Восточной Азии вспышки EV-A71 могли быть вызваны в разные годы различными генотипами вируса (В и С), при этом принципиальных различий клинической картины выявлено не было [23]. Во время вспышки серозного менингита в Хабаровске в 2006 г. от больных чаще всего выделяли E6, однако у части лиц предполагаемым возбудителем менингита был E30, при этом явных различий в течении заболевания, вызванного вирусами разных типов не наблюдалось. Более того, филогенетический анализ показал, что выделенные от больных варианты E6 в ряде случаев имели общего предка за много лет до вспышки, то есть не были связаны между собой эпидемиологически [4]. Кроме того, в ряде работ описана циркуляция варианта вируса, вызвавшего вспышку, до и после нее [6, 13, 34], что также ставит под сомнение роль конкретных мутаций в развитии вспышек.

С другой стороны, есть много примеров указывающих на то, что во время вспышек вирус может получать способность намного чаще вызывать симптоматическую инфекцию или атипичное заболевание. Так, во время вспышки менингоэнцефалита, вызванного EV-A71 в Ростове-на-Дону в 2013 г., 32% (25 из 78) детей с симптомами энтеровирусной инфекции имели неврологические симптомы [6]. Такая частота нейроинфекции резко контрастирует с частотой нейроинфекции в 0,3% от 129 000 детей с везикулярной экзантемой во время вспышки, вызванной EV-A71 на Тайване в 1998 г. [14]. В другой ситуации возникновение новой клинической разновидности экзантемы, вызванной CV-A6, было связано с новым вариантом вируса, который появился незадолго до выявления первых случаев [12]. В подобных ситуациях роль генетических детерминант вирулентности представляется весьма вероятной. В то же время до сегодняшнего дня не опубликовано работ, достоверно доказывающих роль конкретных мутаций в возникновении вспышек заболеваемости. В случае вируса полиомиелита (входящего в вид EV-C) вирулентность, как правило, определяется несколькими мутациями [16, 28], поэтому поиск генетических детерминант вирулентности непوليوмиелитных энтеровирусов может быть очень сложной задачей, решаемой только при масштабном применении высокопроизводительного секвенирования. Не исключено также, что для вирулентности энтеровирусов имеет значение роль минорных мутантных вариантов вирусов, которые присутствуют в популяции, но не определяются при обычном секвенировании по Сэнгеру. Например, безопасность аттенуированной вакцины от полиовируса 3 типа определяется долей нейровирулентной мутации 472 U > C в популяции вируса. Добиться полного отсутствия этой мутации в вакцине технически невозможно,

но при доле мутантов менее 0,8% вакцина практически безопасна, а при доле более 1,2% риск вакцинно-ассоциированного полиомиелита резко возрастает [10]. При этом стандартное секвенирование может выявить только мутации, составляющие более 20% вирусной популяции [36], то есть в принципе не позволяет анализировать такие события. Проверка гипотезы о роли минорных генетически вариантов в возникновении вспышек заболеваемости будет возможна также только при масштабном применении высокопроизводительного секвенирования.

В ряде работ рассматривается возможность предсказывать появление новых энтеровирусных инфекций на основе детекции бессимптомно циркулирующих вирусов. Проблема интерпретации такого результата заключается в том, что расследуются только положительные события (вспышки), и неизвестно, часто ли появление в циркуляции нового варианта вируса не сопровождается подъемом заболеваемости. Более того, такие исследования в идеале должны быть основаны на систематическом мониторинге сточных вод. На сегодняшний день исследование сточных вод имеет определенные ограничения: недостаточная эффективность методов концентрирования, ингибирующее влияние состава сточных вод, затрудняющее применение молекулярных методов, и ряд других. Отсутствие массива данных по надзору за сточными водами не позволяет

оценить статистическую значимость эпизодических наблюдений. Проведение скрининговых исследований материалов от здоровых людей для определения «эпидемического потенциала циркулирующих штаммов» [5] вряд ли может быть широко практически внедрено, а скорее может быть использовано для решения научных задач.

Созданная в последние десять лет в РФ система надзора за энтеровирусами в целом соответствует уровню стран — лидеров в этой области и работает на современном методическом и научном уровне. К сожалению, на сегодняшний день не вполне понятно, как использовать большой объем данных о заболеваемости и молекулярном составе циркулирующих энтеровирусов для эффективного воздействия на эпидемический процесс и принятия оптимальных управленческих решений. Для конвертации достижений надзора в снижение заболеваемости необходимо более глубокое понимание молекулярно-генетических механизмов формирования вариантов энтеровирусов, способных вызывать очаговый подъем заболеваемости. Другой стратегической целью развития надзора за энтеровирусами можно считать внедрение экономически эффективных (то есть высокомультиплексированных) методов определения нуклеотидной последовательности с использованием высокопроизводительного секвенирования.

Список литературы/References

1. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В., Новикова Н.А. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России // Медицинский альманах. 2015. Т. 40, № 5. С. 136–140. [Golitsyna L.N., Zverev V.V., Parfenova O.V., Novikova N.A. Epidemic variants of non-poliomyelitic enteroviruses in Russia. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2015, vol. 40, no. 5, pp. 136–140. (In Russ.)]
2. Лашкевич В.А., Королева Г.А., Лукашев А.Н., Денисова Е.В., Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П. Острый энтеровирусный увеит у детей младшего возраста // Вопросы вирусологии. 2005. Т. 50, № 3. С. 36–45. [Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Lukashhev A.N., Denisova E.V., Katargina L.A., Khoroshilova-Maslova I.P. Acute enterovirus uveitis in young children. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2005, vol. 50, no. 3, pp. 36–45. (In Russ.)]
3. Лукашев А.Н. Роль рекомбинации в эволюции энтеровирусов // Вопросы вирусологии. 2005. Т. 50, № 3. С. 46–52. [Lukashhev A.N. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2005, vol. 50, no. 3, pp. 46–52. (In Russ.)]
4. Лукашев А.Н., Резник В.И., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Каравянская 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. [Lukashhev A.N., Reznik V.I., Ivanova O.E., Eremeyeva T.P., Karavyanskaya T.N., Pereskokova M.A., Lebedeva L.A., Lashkevich V.A., Mikhailov M.I. Molecular epidemiology of ECHO 6 virus, the causative agent of the 2006 outbreak of serous meningitis in Khabarovsk. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 16–21. (In Russ.)]
5. Устюжанин А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Снитковская Т.Э. Значение молекулярно-генетического мониторинга в оценке степени вирулентности и эпидемической значимости штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих среди населения // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2015. Т. 52, № 1. С. 72–76. [Ustyuzhanin A.V., Rezaykin A.V., Sergeev A.G., Snitkovskaya T.E. Molecular genetic surveillance of circulating human non-poliomyelitis viruses strains: implications for the estimates of epidemic significance and virulence. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2015, vol. 52, no. 1, pp. 72–76. (In Russ.)]
6. Akhmadishina L.V., Govorukhina M.V., Kovalev E.V., Nenadskaya S.A., Ivanova O.E., Lukashhev A.N. Enterovirus A71 meningoencephalitis outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, vol. 21, no. 8, pp. 1440–1443. doi: 10.3201/eid2108.141084
7. 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 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 699–708. doi: 10.1016/j.meegid.2008.04.009
8. 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. doi: 10.1099/vir.0.008540-0

9. Centers for Disease Control and Prevention. Certification of poliomyelitis eradication — European Region, June 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2002, vol. 51, no. 26, pp. 572–574.
10. Chumakov K.M., Powers L.B., Noonan K.E., Roninson I.B., Levenbook I.S. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, no. 1, pp. 199–203.
11. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, 2007, vol. 7, pp. 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214
12. Gaunt E., Harvala H., Osterback R., Sreenu V.B., Thomson E., Waris M., Simmonds P. Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *J. Gen. Virol.*, 2015, vol. 96, no. 5, pp. 1067–1079. doi: 10.1099/vir.0.000062
13. Hassel C., Mirand A., Lukashov A., Terletskaialadwig E., Farkas A., Schuffenecker I., Diedrich S., Huemer H.P., Archimbaud C., Peigue-Lafeuille H., Henquell C., Bailly J.L. Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from and among European countries, 2003 to 2013. *Euro Surveill.*, 2015, vol. 20, no. 34. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30005
14. 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. doi: 10.1056/NEJM199909233411301
15. Kheturiani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberste S., Pallansch M.A. Enterovirus surveillance — United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.*, 2006, vol. 55, no. 8, pp. 1–20.
16. Lancaster K.Z., Pfeiffer J.K. Mechanisms controlling virulence thresholds of mixed viral populations. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 19, pp. 9778–9788. doi: 10.1128/JVI.00355-11
17. Lemey P., Rambaut A., Welch J.J., Suchard M.A. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol. Biol. Evol.*, 2010, vol. 27, no. 8, pp. 1877–1885. doi: 10.1093/molbev/msq067
18. Liste M.B., Natera I., Suarez J.A., Pujol F.H., Liprandi F., Ludert J.E. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 8, pp. 2873–2877.
19. 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: e96051. doi: 10.1371/journal.pone.0096051
20. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 19, pp. 10423–10431. doi: 10.1128/JVI.77.19.10423-10431.2003
21. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. Recombination in circulating enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.*, 2005, vol. 86, no. 12, pp. 3281–3290. doi: 10.1099/vir.0.81264-0
22. Lukashov A.N., Vakulenko Y.A. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 2017, vol. 98, no. 12, pp. 2968–2981. doi: 10.1099/jgv.0.000966
23. McMinn P.C. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr. Opin. Virol.*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 199–205. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.009
24. McWilliam Leitch E.C., Bendig J., Cabrerizo M., Cardoso J., Hyypia T., Ivanova O.E., Kelly A., Kroes A.C., Lukashov A., MacAdam A., McMinn P., Roivainen M., Trallero G., Evans D.J., Simmonds P. Transmission networks and population turnover of echovirus 30. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 5, pp. 2109–2118. doi: 10.1128/JVI.02109-08
25. McWilliam Leitch E.C., Cabrerizo M., Cardoso J., Harvala H., Ivanova O.E., Koike S., Kroes A.C., Lukashov A., Perera D., Roivainen M., Susi P., Trallero G., Evans D.J., Simmonds P. The association of recombination events in the founding and emergence of subgroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 5, pp. 2676–2685. doi: 10.1128/JVI.06065-11
26. McWilliam Leitch E.C., Cabrerizo M., Cardoso J., Harvala H., Ivanova O.E., Kroes A.C., Lukashov A., Muir P., Odoom J., Roivainen M., Susi P., Trallero G., Evans D.J., Simmonds P. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 18, pp. 9292–9300. doi: 10.1128/JVI.00783-10
27. Nasri D., Bouslama L., Omar S., Saoudin H., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 8, pp. 2370–2379. doi: 10.1128/JCM.00093-07
28. Nomoto A. Molecular aspects of poliovirus pathogenesis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2007, vol. 83, no. 8, pp. 266–275. doi: 10.2183/pjab/83.266
29. Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M.R., Brown B.A., Pallansch M.A. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, pp. 1288–1293.
30. 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, pp. 1941–1948.
31. 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 Res.*, 2003, vol. 91, pp. 241–248. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00291-5
32. Palacios G., Oberste M.S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.*, 2005, vol. 11, no. 5, pp. 424–433. doi: 10.1080/13550280591002531
33. Puenpa J., Vongpunsawad S., Osterback R., Waris M., Eriksson E., Albert J., Midgley S., Fischer T.K., Eis-Hubinger A.M., Cabrerizo M., Gaunt E., Simmonds P., Poovorawan Y. Molecular epidemiology and the evolution of human coxsackievirus A6. *J. Gen. Virol.*, 2016, vol. 97, no. 12, pp. 3225–3231. doi: 10.1099/jgv.0.000619
34. Savolainen-Kopra C., Paananen A., Blomqvist S., Klemola P., Simonen M.L., Lappalainen M., Vuorinen T., Kuusi M., Lemey P., Roivainen M. A large Finnish echovirus 30 outbreak was preceded by silent circulation of the same genotype. *Virus Genes*, 2011, vol. 42, no. 1, pp. 28–36. doi: 10.1007/s11262-010-0536-x
35. Simonen-Tikka M.L., Hiekka A.K., Klemola P., Poussa T., Ludvigsson J., Korpela R., Vaarala O., Roivainen M. Early human enterovirus infections in healthy Swedish children participating in the PRODIGA pilot study. *J. Med. Virol.*, 2012, vol. 84, no. 6, pp. 923–930. doi: 10.1002/jmv.23284

36. Solmone M., Vincenti D., Prosperi M.C., Bruselles A., Ippolito G., Capobianchi M.R. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 4, pp. 1718–1726. doi: 10.1128/JVI.02011-08
37. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipi A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
38. Van der Sanden S.M., Koopmans M.P., van der Avoort H.G. Detection of human enteroviruses and parechoviruses as part of the national enterovirus surveillance in the Netherlands, 1996–2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, vol. 32, no. 12, pp. 1525–1531. doi: 10.1007/s10096-013-1906-9
39. Witso E., Palacios G., Cinek O., Stene L.C., Grinde B., Janowitz D., Lipkin W.I., Ronningen K.S. High prevalence of human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 11, pp. 4095–4100. doi: 10.1128/JCM.00653-06
40. Wright P.W., Strauss G.H., Langford M.P. Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Am. Fam. Physician*, 1992, vol. 45, no. 1, pp. 173–178.
41. Yakovenko M.L., Gmyl A.P., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Ivanov A.P., Prostova M.A., Baykova O.Y., Isaeva O.V., Lipskaya G.Y., Shakaryan A.K., Kew O.M., Deshpande J.M., Agol V.I. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill.*, 2014, vol. 19, no. 7, pp. 20706.
42. 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 within an enterovirus serotype. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, vol. 30, pp. 244–248. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.033

Авторы:

Лукашев А.Н., д.м.н., профессор РАН, директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

Голицына Л.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Вакуленко Ю.А., младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

Ахмадишина Л.В., к.м.н., зав. лабораторией клинико-диагностической лабораторией Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

Романенкова Н.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Сапега Е.Ю., к.м.н., руководитель центра центра по надзору за энтеровирусами ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Морозова Н.С., зав. отделом обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Троценко О.Е., д.м.н., профессор, директор ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Иванова О.Е., д.м.н., профессор, руководитель отдела полиомиелита и других энтеровирусных инфекций Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; профессор кафедры организации и технологии иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия.

Authors:

Lukashev A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Golitsina L.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Science Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. academician I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Vakulenko Y.A., Junior Researcher, Research Department, Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Akhmadishina L.V., PhD (Medicine), Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Romanenkova N.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sapega E.Yu., PhD (Medicine), Head of Enterovirus Surveillance Center, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Morozova N.S., Head of Epidemiological Surveillance Department, Federal Center of Hygiene and Epidemiology of the Inspectorate for Customers Protection of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation;

Novikova N.A., PhD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Science Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. academician I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Ivanova O.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Poliomyelitis and Other Enterovirus Infections Department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Organization and Technology of Immunobiological Preparations, Institute of Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.