

УДК 616.831.9-002.155-036.22(571.14)
DOI 10.20538/1682-0363-2016-2-20-27

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ РАССЛЕДОВАНИЕ ВСПЫШКИ СЕРОЗНЫХ МЕНИНГИТОВ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Демина А.В.¹, Терновой В.А.^{1,2}, Карташов М.Ю.^{1,3}, Локтев В.Б.^{1,2,3}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор», г. Новосибирск

²Томский государственный университет (ТГУ), г. Томск

³Новосибирский государственный университет (НГУ), г. Новосибирск

РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы явилось расследование вспышки серозных менингитов в Новосибирской области в 2008–2009 гг., а также изучение генетического разнообразия и молекулярно-эпидемиологической характеристики энтеровирусов человека, вызвавших случаи серозного менингита.

Материал и методы. В настоящей работе исследованы образцы спинномозговой жидкости от 199 пациентов с диагнозом «серозный менингит», основанным на клинической картине заболевания (головная боль, ригидность затылочных мышц, температура, тошнота, рвота) и подтвержденным лабораторными исследованиями спинномозговой жидкости (лимфоцитарный цитоз >10 кл/мкл). Все образцы исследованы методом ПЦР на наличие РНК *Enterovirus* и *Flavivirus*, ДНК *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.*

В результате исследования проб отмечено отсутствие РНК *Flavivirus*, ДНК *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.*, однако в 73 образцах (в 37% случаев) была выявлена РНК энтеровирусов (ЭВ). Определение нуклеотидных последовательностей ЭВ по регионам 5'UTR и VP1 выявило их принадлежность к следующим генотипам: наибольшая доля была представлена генотипом ЕСНО 30 (62%); также встречались Сох А2 (8%), Сох А4 (5%), Сох А14 (3%), Сох А16 (5%), Сох В5 (8%), ЕСНО 6 (3%), ЕСНО 9 (3%) и ЕСНО 25 (3%). В 2008 г. большая часть выявленных у населения Новосибирской области изолятов ЭВ, вызывавших симптомы менингита, принадлежала к генотипу ЕСНО 30 (76%). В 2009 г. клинических образцов, содержащих изоляты генотипа ЕСНО 30, обнаружено не было, однако наибольшая доля выявленных энтеровирусов относилась к генотипу Сох А2 (33%) и Сох А4 (22%). Таким образом, в 2008 г. нами зафиксирована вспышка серозных менингитов, основным этиологическим фактором которых являлся энтеровирус ЕСНО 30, а подъем заболеваемости в 2009 г. связан с циркуляцией среди населения новых генотипов энтеровирусов. Исследованные штаммы были депонированы в международной базе GenBank под номерами KP258231-KP258235, HM559584.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серозный менингит, энтеровирусные инфекции, энтеровирусы, *Echovirus*, *Coxsackievirus*, *Enterovirus*.

Введение

Энтеровирусы (ЭВ) человека входят в род *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*, порядка *Picornavirales*. В соответствии с современной классификацией, которая базируется на молекулярно-генетических характеристиках геномов

вирусов, выделяют четыре вида энтеровирусов человека (А, В, С, D), которые подразделяют более чем на 260 генотипов [1, 2]. Энтеровирусы вызывают широкий спектр симптомов от субфебрильной лихорадки, поражения респираторного тракта, миокардитов до серозных менингитов, энцефалитов или параличей и парезов [2].

В последние годы значительно возросла роль неполиомиелитных энтеровирусов человека в

✉ Демина Анна Владимировна, e-mail: Deminaanna@mail.ru

возникновении инфекционных заболеваний [3]. В России ежегодно регистрируются вспышки энтеровирусной инфекции (ЭВИ), вызывающие различные клинические синдромы. Например крупная вспышка острой кишечной инфекции в 2010 г.

в Сахалинской области, основными возбудителями которой были энтеровирусы Коксаки А2, Коксаки А4 [4]. Вспышки ОРВИ, герпангины и ящуроподобного заболевания в 2011–2012 гг. в Нижнем Новгороде, вызванные Коксаки А6 и Коксаки А5 [5]. В 2013 г. в стране уже до октября было зарегистрировано более 13 значительных вспышек энтеровирусных инфекционных заболеваний, из которых самыми крупными оказались массовые заболевания серозным вирусным менингитом в г. Ростове-на-Дону, Москве, Новосибирске и Екатеринбурге, вызванные EV71 [6, 7].

Серозный менингит (воспаление оболочек головного мозга и спинного мозга) является наиболее часто регистрируемым синдромом при энтеровирусной инфекции [8, 9]. Это объясняется выраженными клиническими проявлениями (головная боль, фебрильная лихорадка, тошнота, рвота), что заставляет пациентов обращаться за медицинской помощью, а соответственно позволяет провести лабораторную диагностику и поставить на учет эту инфекционную патологию. В 2008 г. начался подъем заболеваемости серозными менингитами в Новосибирской области, в связи с чем возникла необходимость расследования этиологии данного синдрома с уточнением возбудителей.

Целью настоящей работы явилось расследование вспышки серозных менингитов в Новосибирской области в 2008–2009 гг., а также изучение генетического разнообразия и молекулярно-эпидемиологической характеристики энтеровирусов человека, вызвавших случаи серозного менингита.

Материал и методы

В настоящей работе были исследованы образцы спинномозговой жидкости от 199 пациентов с диагнозом «серозный менингит», основанным на клинической картине заболевания (головная боль, ригидность затылочных мышц, температура, тошнота, рвота), а также подтвержденным лабораторными исследованиями спинномозговой жидкости (лимфоцитарный цитоз >10 кл/мкл). Клинический материал был собран в МБУЗ «Городская инфекционная клиническая больница № 1» г. Новосибирска и в МУЗ «Детская городская клиническая больница № 3» г. Новосибирска в течение 2008–2009 гг. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и кон-

фиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (ред. Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288, Федеральные законы от 02.03.1998 № 30-ФЗ, от 20.12.1999 № 214-ФЗ). На проведение данного исследования было получено одобрение Этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» от 20 мая 2008 г., протокол № 2.

Данное исследование охватило два эпидемиологических сезона – исследованные образцы были собраны в период с мая 2008 г. по сентябрь 2009 г. Заболеваемость ЭВИ в Новосибирской области регистрируется с мая по ноябрь с пиками в сентябре. Однако спорадические случаи ЭВИ встречаются в течение всего года.

Из клинических образцов выделяли РНК и ДНК с использованием набора для выделения на силикагеле РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); кДНК была получена методом обратной транскрипции с использованием набора Реверта-L (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Все образцы были исследованы на наличие РНК *Enterovirus u Flavivirus*, ДНК *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.* Методом ПЦР со специфическими праймерами к ЭВ были получены кДНК-фрагменты регионов VP1 и 5'UTR. Для амплификации района VP1-гена использовали праймеры 224/222 и 292/222 [10], региона 5'UTR – праймеры F903-30/R41-32 и F40-31/R42-33 [4].

Полученные фрагменты кДНК очищали из 2%-й агарозы с применением набора GelExtractionKit (Qiagen, США) и секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130xl. Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы MEGA5 [11] и баз данных NCBI.

Исследованные штаммы были депонированы в международной базе GenBank под номерами KP258231–KP258235, HM559584.

Результаты

Регион 5'UTR геномной РНК пикорнавирусов является относительно консервативным участком их генома, поэтому был использован для установления генотипов энтеровирусов. Для уточнения некоторых генотипов мы дополнительно проводили анализ последовательности района VP1 РНК энтеровирусов.

Из 199 проб спинномозговой жидкости (СМЖ) от больных с симптомами менингита РНК энтеровирусов была выявлена в 73 образцах (37%). У выделенных фрагментов кДНК были определены нуклеотидные последовательности и установлены генотипы энтеровирусов (рис. 1).

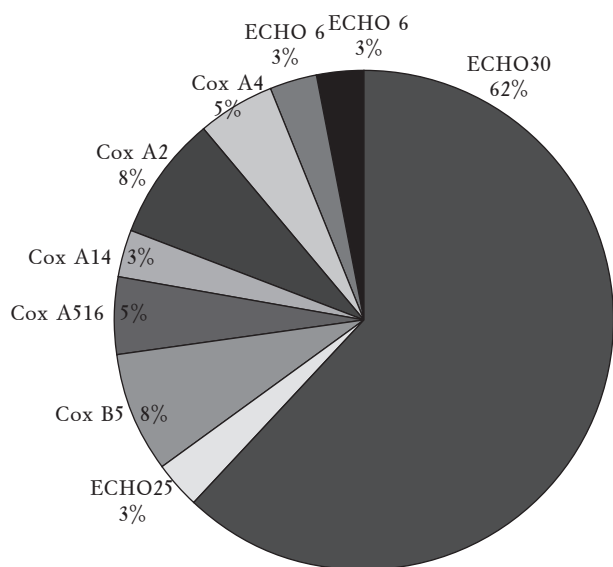


Рис. 1. Генотипы энтеровирусов, выявленных у больных с серозным менингитом в Новосибирской обл. в 2008–2009 гг.

Все образцы были также исследованы на наличие *Flavivirus*, *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.*, что не выявило в них данных возбудителей. Определение нуклеотидных последовательностей энтеровирусов в положительных 73 образцах по регионам 5'UTR и VP1 выявило их принадлежность к следующим генотипам: наибольшая доля была представлена генотипом ECHO 30 (62%); а также встречались Cox A2 (8%), Cox A4 (5%), Cox A14 (3%), Cox A16 (5%), Cox B5 (8%), ECHO 6 (3%), ECHO 9 (3%) и ECHO 25 (3%).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей по 5'UTR геномной РНК выявил принадлежность 62% (из 73 клинических изолятов энтеровирусов) к генотипу ECHO 30. Наиболее близкие по последовательности представители этого генотипа ранее были выявлены в Австралии (Australia-2006(GU236299), Australia-2006(GU236300)), Франции (France-1997(AM237015), France-1997(AM237014), France-1997(AM237013), France-1991(AM237021), France-1992(AM237034)), США (USA-1995(EU870486)) и Нидерландах (Netherlands-2006(DQ534205)).

Из 73 клинических изолятов 8% энтеровирусов по 5'UTR имели генотип Cox A2, наиболее близкий к ним изолят был ранее выявлен в Японии в 2003 г. (Japan-2003(AB126199)); 5% энтеровирусов – генотип Cox A16, и наиболее близкий прототип обнаружен в Китае в 2008 г. (China-2008(FJ198212)). Генотип Cox B5 имели 8% энтеровирусов, наиболее близкий прототип выявлен в Южной Корее в 2000 г. (South Korea-2000 (AY875692)). Наконец, 5% были отнесены к ге-

нотипу Cox A4, и наиболее близкий к ним изолят вируса был обнаружен в Японии в 2003 г. (Japan-2003 (AB126200)).

Еще реже встречались генотипы ECHO 25 (3%) с наиболее близким к нему прототипом в Австралии (Australia-1999(GU236268)) и генотип Cox A14 (3%), прототип которого был выявлен в США в 2003 г. (USA-2003 (AY421769)) (рис. 2).

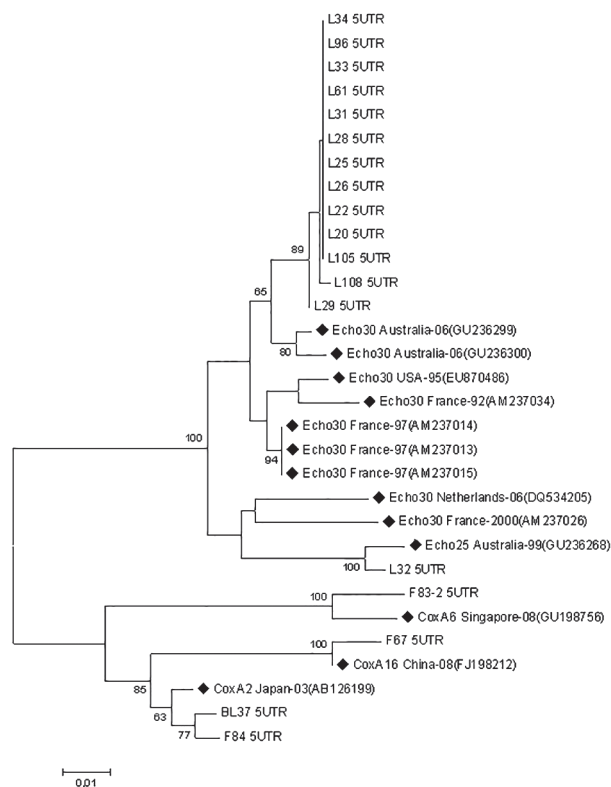


Рис. 2. Филогенетическое древо энтеровирусов ECHO 30, ECHO 25, Cox A6, Cox A16, Cox A2, построенное по последовательностям их 5'UTR (72–521 п.о.). Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры (с помощью программы MEGA5). Цифры около узлов отражают индекс поддержки ветвей. Линия отражает генетическую дистанцию: ♦ – прототипные штаммы; F, L, BL – идентификационные номера исследуемых образцов

Проведенный нами анализ регионов VP1 выявленных изолятов энтеровирусов свидетельствует о том, что генотип ECHO 30 (изолят L105) активно циркулировал в 2008 г. среди населения г. Новосибирска. Другой изолят этого же генотипа (изолят L56) имеет высокий уровень гомологии с прототипным изолятом, распространенным в г. Нижнем Новгороде в 2008 г. (Russia-2008 (GU646397)). Для изолята L119 с генотипом ECHO 30 прототипами явились изоляты, выявленные в разных городах России (г. Оренбург, г. Вологда), Удмуртии в 2008–2009 гг., (Russia-2008 (GQ250164), Russia-2009 (HQ122418),

Russia-2009 (GU646339)). Изолят CL24 относится к генотипу ЕСНО 9, прототип которого также обнаружен в России в г. Нижнем Новгороде в 2009 г. (Russia-2009(GU727585)). Генотипы Сох В5 и ЕСНО 6 ранее были выявлены в Швеции в 1998 г. (Sweden-1998 (AF114383)) и 2002 г. (Sweden-2002 (AF465517)) соответственно (рис. 3).

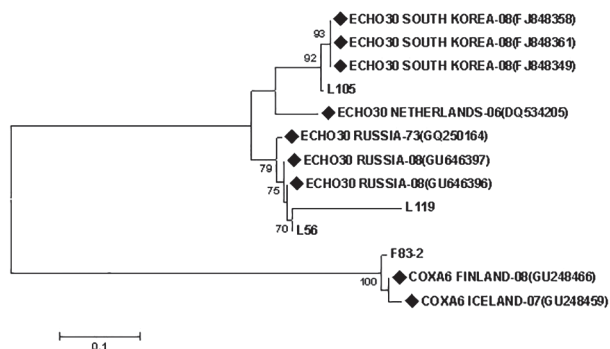


Рис. 3. Филогенетическое древо выявленных нами изолятов энтеровирусов ЕСНО 30 и Сох А6, построенное по нуклеотидным последовательностям фрагмента генома, кодирующего белок VP1 (2612–2969 п.о.): ♦ – прототипные штаммы; F, L – идентификационные номера исследуемых образцов

Встречаемость генотипов энтеровирусов в эпидемические сезоны 2008 и 2009 гг. в Новосибирской области. На рис. 4 видно, что в 2008 г. большая часть выявленных у населения Новосибирской области изолятов энтеровирусов, вызывавших симптомы менингита, принадлежала к генотипу ЕСНО 30 (76%).

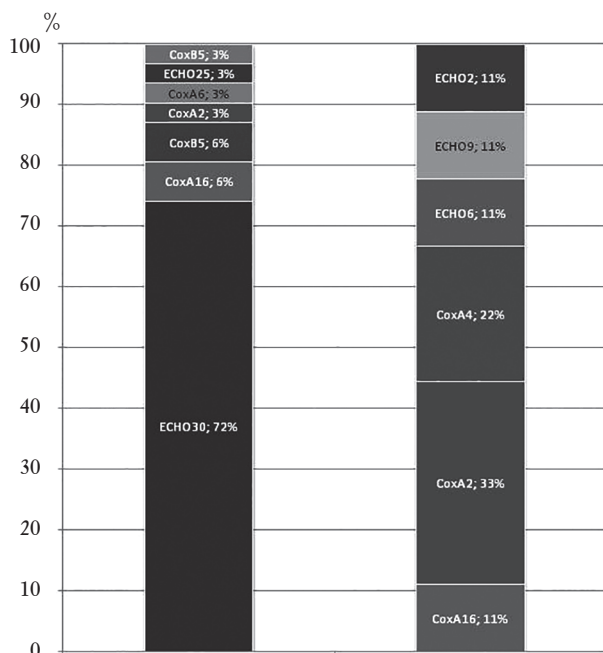


Рис. 4. Распределение генотипов энтеровирусов среди пациентов с энтеровирусной инфекцией в 2008 и 2009 гг.

На долю генотипа Сох В5 приходилось 9%, Сох А16 – 6%, а на долю Сох А6, Сох А2 и Сох А4 – по 3% случаев.

В 2009 г. клинических образцов, содержавших изоляты генотипа ЕСНО 30, в отличие от 2008 г. не обнаружено. Однако в 2009 г. наибольшая доля среди обнаруженных энтеровирусов относилась к генотипу Сох А2 (33%), при этом доля генотипа Сох А4 составила 22%, а на долю ЕСНО 6, ЕСНО 9, ЕСНО 2 и СохА 16 пришлось примерно по 11% на каждый генотип. Среди больных серозными менингитами, вызванными энтеровирусами, в 2009 г. не выявлено изолятов генотипа ЕСНО 30, однако увеличилась доля Сох А16, и появились изоляты новых генотипов: СохА2, Сох А4, ЕСНО 6 и ЕСНО 9.

Таким образом, в 2008 г. нами зафиксирована вспышка серозных менингитов, основным этиологическим фактором которых являлся энтеровирус ЕСНО 30.

В своей работе мы попытались оценить распределение генотипов энтеровирусных возбудителей среди пациентов с энтеровирусной инфекцией, выделенных на территории Новосибирской области в 2008 и 2009 гг. При изучении заболеваемости в течение двух лет выявлено, что для энтеровирусной инфекции в Новосибирской области характерна летне-осенняя сезонность. Эта тенденция коррелирует с данными, опубликованными в литературе [7,12].

Среди общего количества генотипированных нами образцов энтеровирусов наибольшая доля приходилась на вирус ЕСНО 30, что коррелирует с мировыми данными об этиологии энтеровирусных серозных менингитов [9]. Так, в 2008 г. в Новосибирской области на долю ЕСНО 30 приходилось 73% генотипированных образцов, однако в 2009 г. изоляты этого генотипа нам выявить не удалось. Это говорит о циркуляции ЕСНО 30 только в сезоне 2008 г., что подтверждено также данными об обнаружении энтеровируса этого генотипа в сточных водах г. Новосибирска в 2008 г. лабораториями Центра гигиены и эпидемиологии г. Новосибирска [13].

При этом в 2009 г. наибольшая доля среди энтеровирусных возбудителей приходилась на Сох А2 (33%) и Сох А4 (22%), которые не были обнаружены в 2008 г. Такая смена генотипов среди циркулирующих энтеровирусов может быть связана с тем, что значительная доля населения стала иммунорезистентной к ЕСНО 30. При этом появление в 2009 г. других генотипов энтеровирусов, отличающихся серологически от ЕСНО 30, способствовало новому подъему заболеваемости

серозными менингитами энтеровирусной этиологии. Таким образом, подъем заболеваемости в 2009 г. связан с циркуляцией среди населения новых генотипов энтеровирусов.

Заключение

Филогенетический анализ исследованных в 2008–2009 гг. изолятов энтеровирусов свидетельствует о том, что на территории Новосибирской области циркулируют энтеровирусы, генетически близкие (86–99% гомологии) к встречающимся в других странах, что свидетельствует о продолжающейся всемирной циркуляции энтеровирусов с активным вовлечением в нее территории Западной Сибири. Причем внутри России изоляты распространялись по всей стране фактически в пределах года. Китайские и южнокорейские изоляты также быстро попадали на ее территорию, что может быть связано с большим количеством импортируемых из Китая фруктов и овощей. В то же время энтеровирусы из Швеции, Австралии и других стран попали на территорию России с большим запозданием, и вероятно – через заболевших людей.

Полученные нами данные позволяют приоткрыть сложные цепи передачи энтеровирусных инфекций и определить генетические варианты энтеровирусов, специфические для данной территории.

Исследованные штаммы были депонированы в международной базе GenBank под номерами KR258231–KR258235, HM559584.

Источники финансирования

Настоящая работа выполнена за счет финансирования по гранту НШ-2996.2012.4 при государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации, по госконтракту № 02.740.11.0767 «Выявление вирусных возбудителей заболеваний, актуальных для здравоохранения Западной Сибири (гепатиты, гастроэнтериты, серозный менингит), изучение их генетического разнообразия в целях разработки и совершенствования диагностикумов», по договору НГУ с Министерством образования и науки № 11.G34.31.0034 «Новые подходы к разработке лекарств: поиск, отбор и конструирование непатогенных для человека штаммов вирусов, перспективных для использования в качестве онколитических препаратов», а также при финансовой поддержке Минобрнауки России (госконтракт №16.M04.12.0028) и в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Россий-

ской Федерации», ФЦП «Межгосударственная целевая программа ЕвразЭС», государственный контракт от 12.11.2014 г. № 14.M04.12.0019.

Благодарности. Мы благодарим наших коллег из МБУЗ «Городская инфекционная клиническая больница № 1» г. Новосибирска за сотрудничество. Выражаем искреннюю признательность за поддержку этой работы д-ру биол. наук, профессору Нетесовой С.В.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. King A.M., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. 2011. № 1. P. 1338.
2. Ronellenfitch S., Tabatabai J., Bytcher S. et al. First report of a Chinese strain of coxsackie B3virus infection in a newborn in Germany in 2011: a case report // Journal of Medical Case Reports. 2014. № 8. P. 164.
3. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases // Infection, Genetics and Evolution. V. 14. 2013. P. 282–293.
4. Демина А.В., Терновой В.А., Дарижапов Б.Б., Якубич Т.В., Семенцова А.О., Демина О.К., Протопопова Е.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П., Нетесов С.В. Вспышка острой кишечной инфекции энтеровирусной этиологии в Сахалинской области в августе 2010 г. // Вестник РАМН. 2012. № 2. С. 64–68.
5. Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Парфенова О.В., Калашникова Н.А., Новикова Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика эпидемически значимых энтеровирусов вида А // Медицинский альманах. 2013. Т. 26, № 2. С. 96–99.
6. Демина А.В., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Протопопова Е.В., Терновой В.А. Молекулярно-биологическое исследование серозных менингитов в Ростове-на-Дону в 2013 г. // VI Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням, 24–26 марта 2014 г. Москва. <http://www.congress-infection.ru/archiv.htm>.
7. Петрова И.С., Шишов А.С., Базарова М.В., Русанова С.А., Бургацова О.А., Бланк И.А., Лева В.Г., Шуфренкова Е.Н., Москалева Е.И. Особенности течения энтеровирусных инфекций с менингитом у взрослых в эпидемическом сезоне 2013 года // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. Т. 18, № 3. С. 15–21.
8. Takeshima S., Neshige S., Himeno T., Hara N., Yoshimoto T., Takamatsu K., Takao S., Kuriyama M. Clinical, epidemiological, and etiological studies of aseptic meningitis in adults. // RinshoShinkeigaku. 2014. V. 54, № 10. P. 791–797.

9. Mladenova Z., Buttinelli G., Dikova A., Stoyanova A., Troyancheva M., Komitova R., Stoycheva M., Pekova L., Parmakova K., Fiore L. Aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 30 in two regions in Bulgaria, May-August 2012 // *Epidemiol Infect.* 2014. Oct. V. 142, № 10. P. 2159–2165.
10. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V. 44. P. 2698–2704.
11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution.* 2011. № 28. P. 2731–2739.
12. Ortner B., Huang C.-W., Schmid D., Mutz I., Wewalka G., Allerberger F., Yang J.-Y., Huemer H.P. Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999–2007: detection of clusters of echovirus 30 and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes // *J. Med. Virol.* 2009. V. 81. P. 317–324.
13. Щербатов А.Ф., Иванова Л.К. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке и соблюдении законодательства в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в Новосибирской области в 2010 г.»

Поступила в редакцию 07.12.2015 г.

Утверждена к печати 15.03.2016 г.

Демина Анна Владимировна (✉) – канд. мед. наук, врач-инфекционист, ст. научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Терновой Владимир Александрович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии ООИ ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск), ТГУ (г. Томск).

Карташов Михаил Юрьевич – мл. научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск), ТГУ (г. Томск).

Локтев Валерий Борисович – д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск), ТГУ (г. Томск), НГУ (г. Новосибирск).

✉ Демина Анна Владимировна, e-mail: Deminaanna@mail.ru

ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, г. Кольцово, Новосибирской обл. e-mail: vector@vector.nsc.ru, тел. (383)-363-47-10.

ТГУ, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, e-mail: rector@tsu.ru, тел. (382-2)-52-95-85.

НГУ, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, (383)-363-40-02.

MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE OUTBREAK OF ASEPTIC MENINGITIS IN NOVOSIBIRSK REGION

Demina A.V.¹, Ternovoi V.A.^{1,2}, Kartashov M.YU.^{1,3}, Loktev V.B.^{1,2,3}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russian Federation

² Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the outbreak of aseptic meningitis in the Novosibirsk region in 2008–2009. We studied genetic diversity and molecular-epidemiological characteristics of human enteroviruses that caused aseptic meningitis.

Materials and methods. In the present study we investigated samples of cerebrospinal fluid from 199 patients with a diagnosis “aseptic meningitis”, based on the clinical characteristics of the disease (headache, stiff neck, fever, nausea, vomiting), and confirmed by laboratory tests of spinal fluid (lymphocyte cell count > 10 cells/ml).

All samples were tested by PCR for RNA of *Enterovirus* and *Flavivirus* and DNA *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.*

In the samples there were not found RNA *Flavivirus*, DNA *Myc. tuberculosis*, *Borrelia spp.*, *Neisseria spp.*, but in 73 samples (37%) was identified RNA enterovirus (EV). Determination of nucleotide sequences of 5'UTR and VP1-region of EV revealed that they belong to the following genotypes: the highest percentage was presented by genotype ECHO 30 (62%); another genotypes were Cox A2 (8%), Cox A4 (5%), Cox A14 (3%), Cox A16 (5%), Cox B5 (8%), ECHO 6 (3%), ECHO 9 (3%) and ECHO 25 (3%). In 2008 most of the EV that caused the symptoms of aseptic meningitis belonged to genotype ECHO 30 (76%). In 2009 the clinical specimens containing genotype ECHO 30 were not found, but the largest percentage of EV belonged to genotypes Cox A2 (33%) and Cox A4 (22%). Thus, in 2008 we recorded outbreak of aseptic meningitis, the major etiological factor was enterovirus ECHO 30. And the rise of the incidence of aseptic meningitis in 2009 is related to the circulation of new genotypes of EV. The investigated strains were deposited in an international database GenBank under accession numbers KP258231-KP258235, HM559584.

KEY WORDS: meningitis, enterovirus infections, enteroviruses, Echovirus, Coxsackievirus, Enterovirus.

Bulletin of Siberian Medicine, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 20–27

References

- King A.M., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. 2011. № 1. P. 1338.
- Ronellenfitch S., Tabatabai J., Böttcher S. et al. First report of a Chinese strain of *Coxsackie* B3 virus infection in a newborn in Germany in 2011: a case report // *Journal of Medical Case Reports*. 2014. № 8. P. 164.
- Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases // *Infection, Genetics and Evolution*. V. 14. 2013. P. 282–293.
- Demina A.V., Ternovoi V.A., Darizhapov B.B., YAkubich T.V., Sementsova A.O., Demina O.K., Protopopova E.V., Loktev V.B., Agafonov A.P., Netesov S.V. Vspyshka ostroj kishhechnoj infekcii ehnterovirusnoj ehtologii v Sahalinskoj oblasti v avguste 2010 g. [Outbreak of acute intestinal infections of enterovirus etiology in the Sakhalin region in August 2010]. *Vestnik RAMN*, 2012, № 2. pp. 64–68 (in Russian).
- Golicyna L.N., Fomina S.G., Parfenova O.V., Kalashnikova N.A., Novikova N.A. Molekulyarno-geneticheskaya harakteristika ehpidemicheski znachimyh ehnterovirusov vida A [Molecular-genetic characterization of epidemically significant enterovirus type A]. *Medicinskij al'manab*, 2013, vol. 26. No 2, pp. 96–99 (in Russian).
- Demina A.V., Kartashov M.Yu., Chausov E.V., Protopopova E.V., Ternovoj V.A. Molekulyarno-biologicheskoe issledovanie seroznyh meningitov v Rostove-na-Donu v 2013 g. [Molecular-biological research of serous meningitis in Rostov-on-Don in 2013]. VI Ezhegodnyj Vserossijskij Kongress po infekcionnym boleznyam, 24–26 marta 2014 g., Moskva. <http://www.congress-infection.ru/archiv.htm> (in Russian).
- Petrova I.S., Shishov A.S., Bazarova M.V., Rusanova S.A., Burgasova O.A., Blank I.A., Leva V.G., Shurenkova E.N., Moskaleva E.I. Osobennosti techeniya ehnterovirusnyh infekcij s meningitom u vzroslyh v ehpidemicheskom sezone 2013 goda [Peculiarities of enterovirus infection in adults with meningitis in an epidemic season of 2013] *Epidemiologiya i infekcionnye bolezni*, 2014, vol. 18. No 3, pp. 15–21 (in Russian).
- Takeshima S., Neshige S., Himeno T., Hara N., Yoshimoto T., Takamatsu K., Takao S., Kuriyama M. Clinical, epidemiological, and etiological studies of aseptic meningitis in adults // *RinshoShinkeigaku*. 2014. V. 54. № 10. P. 791–797.
- Mladenova Z., Buttinelli G., Dikova A., Stoyanova A., Troyancheva M., Komitova R., Stoycheva M., Pekova L., Parmakova K., Fiore L. Aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 30 in two regions in Bulgaria, May–August 2012 // *Epidemiol Infect.* 2014. Oct. V. 142. № 10. P. 2159–2165.
- Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V. 44. P. 2698–2704.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. № 28. P. 2731–2739.
- Ortner B., Huang C.-W., Schmid D., Mutz I., Wewalka G., Allerberger F., Yang J.-Y., Huemer H.P. Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999–2007: detection of clusters of echovirus 30

and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes // J. Med. Virol. 2009. V. 81. P. 317–324.

13. Shcherbatov A.F., Ivanova L.K. Gosudarstvennyj doklad «O sanitarno-ehpidemiologicheskoy obstanovke i soblyudenii zakonodatel'stva v sfere zashchity prav potre-

bitelej i blagopoluchiya cheloveka v Novosibirskoj oblasti v 2010 g.» [State report “The sanitary-epidemiological situation and the observance of legislation on protection of consumer rights and human well-being in the Novosibirsk region in 2010”] (in Russian).

Demina Anna V. (✉), State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russian Federation.

Ternovoi Vladimir A., State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russian Federation; Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation.

Kartashov Michail Yu., State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russian Federation; Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation.

Loktev Valeriy B., State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk, Russian Federation; Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation; Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

✉ **Demina Anna V.**, e-mail: Deminaanna@mail.ru

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630599, e-mail: vector@vector.nsc.ru, ph. (383)-363-47-10.

National Research Tomsk State University, 36, Lenina Av., Tomsk, 634050, e-mail: rector@tsu.ru, ph. (382-2)-52-95-85.
Novosibirsk State University, 2, Pirogova St., Novosibirsk, 630090, ph. (383)-863-40-2.