НОВЫЙ ГЕНОТИП НОРОВИРУСОВ GII.17 — ПРИЧИНА РОСТА ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В БЕЛАРУСИ В 2015 г.

Лозюк С.К., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Дедюля К.Л., Богуш З.Ф.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Норовирусы являются сегодня признанными доминирующими возбудителями вспышек острых гастроэнтеритов, что определяет особую актуальность изучения этиологических аспектов норовирусной инфекции (НИ).

Настоящая работа, выполненная в рамках молекулярно-эпидемиологического мониторинга за норовирусной инфекцией в Республике Беларусь, посвящена анализу результатов молекулярного типирования возбудителей и их филогенетического анализа. Исследования в 2015 г. позволили расшифровать 6 эпизодов групповой заболеваемости НИ, вызванной появлением на территории страны нового генотипа норовирусов — GII.17. Результаты анализа генетической структуры и антигенных характеристик данного генотипа указывают на его значительный эпидемический потенциал и возможность длительного доминирования в мировом масштабе.

Ключевые слова: норовирусы, групповая заболеваемость.

Введение. Норовирусы являются основной причиной групповой заболеваемости острым гастроэнтеритом (ОГЭ) во всем мире, вызывая до 93% вспышек в развитых странах. Так, каждый год в США фиксируется 64000 эпизодов диареи, требующих госпитализации. В промышленно развитых странах ежегодно регистрируется до 900000 обращений в клиники детей с НИ, в развивающихся странах норовирусы являются причиной до 200000 смертей детей до 5 лет ежегодно [1]. Норовирусную инфекцию называют «кишечный грипп» не только из-за похожей сезонности и отсутствия эффективной терапии, но и за высокую инфекционность и быструю изменчивость возбудителя.

Норовирусами могут заражаться лица всех возрастов, однако симптомы проявляются преимущественно у маленьких детей и пожилых людей. Они включают диарею, рвоту, тошноту, боли в желудке, а также лихорадку и головные боли. Вместе с тем НИ может протекать и бессимптомно, что характерно для взрослых с хорошим иммунитетом. Для данной инфекции характерен фекально-оральный механизм передачи возбудителей, который реализуется 4 путями — контактно-бытовым, пищевым, водным, воздушно-капельным. Отличительной особенностью норовирусов является их высокая контагиозность и крайне низкая инфицирующая доза (от 18 до 1000 вирусных частиц), а также длительный период выделения в окружающую среду после исчезновения клинических проявлений вызываемой ими инфекции. Сочетание этих характеристик с высокой термостабильностью (от 0 до 60ºС) данных вирусных патогенов приводит к регулярной норовирусной контаминации различных продуктов питания, объектов окружающей среды, грунтовых и питьевых вод. Из-за значительного генетического разнообразия норовирусов в пределах рода, в основе которого лежит генетический дрейф и рекомбинация, их антигенное разнообразие также весьма велико, что не позволяет сформироваться длительному иммунитету, эффективно предотвращающему заболевание, вызванное другим генотипом вируса [2]. По этим причинам норовирусы быстро и активно распространяются в закрытых учреждениях, таких как больницы, госпитали, гостиницы, школы, детские сады, круизные лайнеры, военные учреждения и др.

РНК генома норовирусов содержит три открытых рамки считывания (ORFs): ORF1, ORF2, и ORF3.

ORF1 кодирует неструктурные белки N и C терминальные белки, p48, NTP-азу, 3C-подобную протеазу и высококонсервативную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). ORF2 кодирует основной вирусный капсидный белок — VP1, состоящий из домена оболочки (S) и двух выступающих (P) доменов. Домен P делится на P1 и P2 субдомены. Поскольку P2 субдомен находится на поверхности капсида, он имеет наиболее гипервариабельную последовательность и содержит участок связывания с рецептором клетки-хозяина, подобный антигену группы крови (HBGA) [3]. ORF3 кодирует минорные белки капсида (VP2).

У норовирусов выделяют 6 геногрупп (GI-GVI), 3 из них патогенны для человека (геногруппы GI, GII и GIV). Геном норовирусов весьма разнообразен и различия между нуклеотидными последовательностями пяти геногрупп (GI-GV) составляют примерно 46% нуклеотидов. Каждая из геногрупп включает несколько генотипов. GII является преобладающей геногруппой и вызывает более 70% вспышек НИ. При этом сегодня наиболее

распространенным в мире является генотип GII.4, с которым связано, по крайней мере, четыре глобальные эпидемии гастроэнтерита за последние 15 лет (1995–1996, 2002–2003, 2004–2005, 2006–2007) [4]. На его долю приходится >80% всех вспышек норовирусной ифекции. Частое появление новых геновариантов GII.4 связано с его выраженной и быстрой антигенной изменчивостью в ответ на коллективный иммунитет [5]. Новые варианты генотипа GII.4 возникают почти каждые 2 года, что сопровождается глобальной эпидемией острого гастроэнтерита. Начиная с середины 90-х гг. XX в., имело место последовательное появление и глобальное распространение следующих эпидемических геновариантов GII.4: Lordsdale 1996, Farmington Hills 2002 года, Hunter 2004 г., Yerseke 2006a, Den Haag 2006b, Apeldoorn 2007 г., New Orleans 2009 г. и в последнее время Sydney 2012.

Два последних эпидемических геновариант — New Orleans 2009 и Sydney 2012 — обладали не только новым антигенным вариантом, но и рекомбинацией в ORF1/ORF2 области. Оба они активно циркулировали во всем мире, в т. ч. и в Беларуси. Рекомбинация норовирусов, как известно, происходит в области ORF1/ORF2 и в сайте инициации транскрипции вирусной субгеномной РНК. Реже она происходит в области ORF2/ORF3 GII.4 штаммов [6]. В конце 2012 г. существующие во многих странах системы наблюдения (в т. ч. Соединенное Королевство, Нидерланды, Япония, Австралия, Франция, Новая Зеландия и Соединенные Штаты) зарегистрировали повышенные уровни норовирусной активности по сравнению с предыдущими сезонами, что было связано с появление нового варианта GII.4 Sydney 2012 [7]. Как показывает практика, регулярный мониторинг за возникновением новых генотипов и геновариантов норовирусов, способных обладать повышенной вирулентностью и быть причиной изменений в патогенезе заболевания, имеет исключительно важное значение для здравоохранения в плане прогнозирования возможных сценариев развития эпидситуации с целью профилактики норовирусной заболеваемости.

Цель работы — изучение результатов молекулярного типирования возбудителей и их филогенетический анализ. В работе представлены данные о групповой и спорадической заболеваемости в 2015 г., вызванной новым для нашей страны генотипом GII.17, а также о его географическом распространении.

Материалы и методы. Исследовали 263 пробы стула от пациентов с ОКИ, поступивших из инфекционных клиник и центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья гг. Минска, Могилева, Бреста и Гродно.

Пробоподготовка клинического материала включала получение 10% суспензии образцов стула в транспортной среде («АмплиСенс», РФ) с последующим центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин и отбором надосадочной жидкости.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли коммерческие наборы «Рибо-преп» («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкциями по применению. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Риверта-L» («АмплиСенс», РФ), следуя рекомендациям изготовителя.

Первичную детекцию вируса осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия).

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали Diamant HF ДНК полимеразу, 2,5х реакционный буфер «HF», содержащий 0,5 мМ смесь дезоксинуклеотидов и 5 мМ раствор $MgCl_2$ (ГНУ «Институт микробиологии НАН Б», РБ). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов, синтезированных фирмой PrimeTech (РБ).

Реакцию секвенирования производили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США). Детекцию результатов осуществляли на приборе CEQ 8000 (Beckman coulter, США), анализ результатов — в MEGA6 (Тамура, Стечер, Петерсон, Филипски и Кумар 2013).

Молекулярное типирование проводили с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования по адресу http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool.

Результаты и их обсуждение. В 2015 г. в Республике Беларусь было зарегистрировано 6 эпизодов групповой заболеваемости острым гастроэнтеритом в закрытых коллективах, количество заболевших составило более 200 человек (таблица).

Таблица — Сводные данные по эпизодам групповой заболеваемости в 2015 г.

Дата регистрации	Регион	Клинический диагноз	Число обследованных	Возраст	Этиологический агент	Доля пациентов с лабораторно подтвержденной норовирусной этиологией	Генотип возбудителя
21.09.2015	Минск	н. д.	9	7–14 лет	Норовирус II типа	100%	GII.17
16.10.2015	Плещеницы	н. д	16	н. д.	Норовирус II типа	50%	GII.17
15.10.2015	Печи	н. д	19	18–27 лет	Норовирус II типа	63%	GII.17
20.10.2015	Воложин	н. д	42	18–27 лет	Норовирус I типа	74%	GI.3
07.09.2015	Новополоцк	ОГЭ	9	1 год — 13 лет	Норовирус II типа	55%	GII.17

Репозиторий БГМУ

По результатам лабораторной диагностики этиологическими агентами всех эпизодов данной групповой заболеваемости оказались норовирусы. В процессе их генотипирования было установлено, что этиологическим агентом 5 эпизодов был генотип GII.17, один эпизод был связан с генотипом GI.3.

Следует отметить, что генотип GII.17 не регистрировался на территории нашей страны в течение предшествующего периода наблюдения (с 2009 по 2014 гг.). Для установления времени его появления проведено ретроспективное молекулярное типирование норовирусов, вызвавших спорадическую заболеваемость в 2015 г. С этой целью проанализирован поступивший в течение предшествующего периода (до сентября 2015 г.) в Республиканскую референс-лабораторию диагностики кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии клинический материал от 131 пациента с подозрением острого норовирусного гастроэнтерита (n = 131). У половины из числа этих пациентов норовирусная инфекция была подтверждена лабораторно. По результатам молекулярного типирования обнаруженных возбудителей в I полугодии 2015 г. в г. Минске циркулировали норовирусы 2-х геновариантов — G II.4 New Orleans-GII.4 Sydney и GII.4e-GII.4 Sydney (40 и 60% соответственно). Полученные данные свидетельствовали о том, что циркуляция генотипа GII.17 до сентября 2015 г. на территории Беларуси не регистрировалась. Таким образом, стало очевидно, что резкий рост групповой заболеваемости осенью 2015 г. был обусловлен появлением нового для населения Беларуси генотипа норовирусов — GII.17.

Для установления источников инфицирования и путей передачи инфекции было проведено молекулярно-эпидемиологическое расследование 2-х эпизодов групповой заболеваемости, в ходе которого обследовано 23 работника, вовлеченных в приготовление пищи. По результатам генодиагностики у 43,5% обследованных были выявлены норовирусы. Опрос данных сотрудников не позволил установить наличие у них каких-либо клинических проявлений НИ, что указывало на бессимптомное носительство возбудителей. Как свидетельствовали результаты молекулярного типирования выявленных у работников пищеблоков норовирусов, они относились к генотипоам GII.17 и GI.3, которые, как было установлено ранее, были этиологическими агентами соответствующих эпизодов групповой заболеваемости. Все вирусоносители были отстранены от процесса приготовления пищи и подвергнуты повторному лабораторному обследованию с интервалом в 2 недели, которое показало, что у 9 работников выделение норовируса прекратилось уже через 2 недели, а у 1 — через 4 недели.

Появление нового генотипа норовирусов, обладавшего значительным эпидемическим потенциалом, диктовало необходимость дальнейшего мониторинга его распространения по территории страны. Для этого были проанализированы 62 пробы клинического материала (фекалии), полученные от пациентов с симптомами ОГЭ на территории Минской, Гродненской, Брестской и Могилевской областей. В ходе данных исследований норовирусы были обнаружены в 85% поступивших проб. По результатам их молекулярного типирования установлено, что на территории Минской области 100% исследованных проб содержали норовирусы генотипа GII.17. В Гродненской области циркулировали норовирусы генотипов GII.17 (50%), GII.4 (33%) и GII.7 (17%), в Брестской области — генотипов GII.Pe (67%), GII.4 (16,5%) и GII.21 (16,5%), в Могилевской — генотипов GII.Pe (50%) и GII.4 (50%).

Регулярный молекулярно-эпидемиологический мониторинг НИ проводится в Беларуси с 2009 г. по настоящее время. По его результатам за этот период было идентифицировано 9 генотипов норовирусов, среди которых доминировал преобладающий в мировом масштабе генотип GII.4. В 2012–2014 гг. норовирусная спорадическая заболеваемость была обусловлена двумя эпидемическими геновариантами GII.4 генотипа — G II.4 New Orleans/G II.4 Sydney и GII.4e/GII.4 Sydney. Резкий подъем групповой заболеваемости в 2015 г. был обусловлен появлением на территории Беларуси нового генотипа норовирусов — GII.17. По литературным данным, генотип GII.17 впервые был зарегистрирован в 2014–2015 гг. в странах Азии, где вызвал значительный подъем заболеваемости. В связи с активным распространением он стал предметом детального изучения специалистов различных стран. Установлено, что генотип GII.17 характеризуется изменениями антигенной структуры, позволяющими ему ускользать от распознавания иммунной системой, а также высокой скоростью мутаций, что в совокупности определяет его высокий эпидемический потенциал. Появление данного генотипа в Беларуси диктует необходимость регулярного изучения молекулярных характеристик циркулирующих изолятов для предотвращения дальнейшего роста норовирусной заболеваемости.

Заключение. Результаты молекулярно-эпидемического мониторинга за НИ в 2015 г. позволили расшифровать 6 эпизодов групповой заболеваемости, вызванных появлением на территории страны нового генотипа норовирусов — GII.17. Данный генотип представлен новым в глобальном масштабе геновариантом Kawasaki 2014, который вызвал значительное обострение эпидситуации и многочисленные вспышки острого гастроэнтерита в различных странах мира. После подъема групповой заболеваемости осенью 2015 г. новый геновариант Kawasaki 2014 генотипа GII.17 продолжает распространяться по территории Республики Беларусь. Результаты анализа генетической структуры и антигенных характеристик генотипа GII.17 указывают на его значительный эпидемический потенциал и возможность длительного доминирования в мировом масштабе. В этой связи крайне актуальным является осуществление регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга за НИ, первым и важным этапом которой является генодиагностика регистрируемой заболеваемости ОКИ. Для этого в нашей стране имеется все необходимое: соответствующие инструктивно-методические документы [8, 9] и диагностическая тест-система для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР» (ТУ BY 100558032.375-2016), которая способна эффективно обнаруживать все известные на сегодняшний день генотипы норовирусов.

Репозиторий БГМУ

Литература

1. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis / M.M. Patel [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14, № 8. — P. 1224–1231.

2. Glass, R.I. Norovirus gastroenteritis / R.I. Glass, U.D. Parashar, M.K. Estes // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361, № 18. — P. 1776–1785.

3. Tan, M. The p domain of norovirus cap-sid protein forms a subviral particle that binds to his-to-blood group antigen receptors / M. Tan, X. Jiang // J. Virol. — 2005. — Vol. 79, № 22. — P. 14017–14030.

4. Bull, R.A. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution / R.A. Bull, P.A. White // Trends Microbiol. — 2011. — Vol. 19, № 5. — P. 233–240.

5. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 anti-genic variation / L.C. Lindesmith [et al.] // PLoS Pathog. — 2012. — Vol 8, № 5. — e1002705. doi: 10.1371.

6. Sung-Geun, L. Molecular epidemiology of norovirus in South Korea / L. Sung-Geun, Ch. Han-Gil, P. Soon-Young // BMB Rep. — 2015. — Vol. 48, № 2. — P. 61–67.

7. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012 / J. van Beek [et al.] // Euro Surveill. — 2013. — Vol. 18, № 1. — P. 8–9.

8. Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций: инструкция по применению: утв. 2010 г. рег. № 111-1210 / Т.В. Амвросьева [и др.]; Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. — Минск: БГМУ, 2011. — 23 с.

9. Алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции [Электронный ресурс]: инструкция по применению: утв. 25.03.2014 рег. № 014-1213 / Т.В. Амвросьева [и др.]; Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. — Режим доступа: http://med.by/methods/pdf/014-1213.pdf. — Дата доступа: 16.04.2016.

NEW NOROVIRUS GENOTYPE GII.17 — CAUSE OF GROWTH GROUP DISEASE IN BELARUS IN 2015

Laziuk S.K., Poklonskaya N.V., Amvroseva T.V., Kazinets O.N., Dedyulya K.L., Bogush Z.F.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus

Noroviruses are now recognized as the dominant agents of outbreaks of acute gastroenteritis that determines the urgency of studying the etiological aspects of norovirus infection. This work presents the results of molecular epidemiological monitoring of norovirus infection in the Republic Belarus. The results of laboratory assay and molecular epidemiological monitoring of norovirus infections in 2015 allowed to decipher the 6 episodes of group morbidity caused by the appearance on the territory of our country of new genotypes — GII.17. Analysis of its genetic structure and antigenic characteristics indicate its significant epidemic potential and the possibility of long-term dominance in the world.

Keywords: norovirus, a group the incidence.

Поступила 19.05.2016

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ