

на правах рукописи

Фомина Светлана Григорьевна

**ПЕЙЗАЖ ЭНТЕРОВИРУСОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ
ИНФЕКЦИЕЙ**

03.02.02. – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора.

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор

Новикова
Надежда Алексеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Институт вакцин и сывороток
им.И.И.Мечникова» РАМН,
заместитель директора Института
Кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Институт полиомиелита и
вирусных энцефалитов им.М.П.Чумакова
РАМН, ведущий научный сотрудник

Юминова
Надежда Васильевна

Еремеева
Татьяна Петровна

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки
"Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Пастера"

Защита состоится: «15» ноября 2013 г. в 12 часов на заседании диссертационного
совета Д 001.026.01. в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П.Чумакова» РАМН по
адресу: 142782, г. Москва, поселение Московский, пос. Институт полиомиелита.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного учреждения «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
им. М.П.Чумакова» РАМН

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

О.А. Медведкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Энтеновирусы (ЭВ) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*, порядок *Picornavirales*) играют важную роль в инфекционной патологии человека, вызывая заболевания, различающиеся по клиническим проявлениям и тяжести течения: от бессимптомного носительства до тяжелых заболеваний, таких как полиомиелит, серозный менингит и энцефалит, геморрагический конъюнктивит, параличи и т. д. [Pallansch, Roos, 2007]. В последнее десятилетие активизация эпидемического процесса энтеровирусной (неполио) инфекции (ЭВИ) отмечается во многих странах мира. Нестабильная ситуация по заболеваемости ЭВИ в Российской Федерации обусловлена регистрацией эпидемических очагов с групповыми случаями заболеваний, сезонными эпидемическими подъемами заболеваемости, возможностью завоза энтеровирусов с сопредельных территорий и государств, а так же отсутствием специфических методов профилактики ЭВИ [Программа "Эпидемиологический..."; Лукашев, 2010].

Энтеровирусы человека представлены более чем 100 генетически гетерогенными серотипами, которые на основании молекулярно-биологических свойств разделены на 4 вида: ЭВ-А (Коксаки А 2-8, 10, 12, 14, 16; ЭВ 71, 76, 89-91, 114), ЭВ-В (Коксаки В1-6; Коксаки А9; ЕСНО 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33; ЭВ 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, 110), ЭВ-С (полиовирусы типа 1-3; Коксаки А1, 11, 13, 17, 19-22, 24; ЭВ 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116) и ЭВ-Д (ЭВ 68, 70, 94, 111) [www.picornaviridae.com]. Множество типов неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), недостаток знаний о масштабах их распространения, спектре эпидемически значимых серотипов и генетических вариантов, доминирующих в определенное время в конкретном географическом районе, обуславливают актуальность постоянного слежения за циркуляцией ЭВ среди населения с использованием молекулярно-генетических технологий.

В зарубежных странах мира контроль распространения НПЭВ базируется на исследовании проб от больных со всеми клиническими формами ЭВИ, в том числе и с острой кишечной инфекцией (ОКИ) [CDC, 2006; CDC, 2010; Antona, 2007; Baek, 2009; Roth, 2007; Kapusinszky, 2010; Khetsuriani, 2010; Bahri, 2005; Ortner, 2009; Trallero, 2010]. В Российской Федерации наблюдение за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов проводят в рамках введенного в действие в 2006 г.

эпидемиологического надзора за энтеровирусной (неполио) инфекцией. Контроль циркуляции осуществляют при анализе проб из объектов внешней среды и клинического материала от больных с ЭВИ и подозрением на ЭВИ с тяжелой специфической клиникой (в первую очередь с нейроинфекциями) [МУ 3.1.1.2363-08]. Значимость обследования детей с диарейными заболеваниями для мониторинга циркуляции НПЭВ не показана. В связи с этим представляло научно-практический интерес проведение исследований, направленных на выявление и молекулярно-генетическую характеристику НПЭВ у детей с проявлениями ОКИ.

Цель исследования: изучение пейзажа энтеровирусов у детей с острой кишечной инфекцией в Нижегородской области с использованием молекулярно-генетических методов исследования.

Задачи исследования:

1. С использованием молекулярно-генетических методов детекции определить частоту обнаружения энтеровирусов (в том числе неполиомиелитных энтеровирусов и вирусов полиомиелита) у детей, госпитализированных с острой кишечной инфекцией в г. Н. Новгороде.
2. Провести анализ циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов в многолетней и годовой динамике. Определить частоту их обнаружения у детей с острой кишечной инфекцией разного возраста.
3. Установить первичную структуру серотипового участка гена VP1 энтеровирусов.
4. Охарактеризовать спектр серотипов и видовое распределение неполиомиелитных энтеровирусов.
5. Изучить генетическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения штаммов неполиомиелитных энтеровирусов одного типа, выявленных у детей с острой кишечной инфекцией и при других формах энтеровирусной инфекции.

Научная новизна работы:

Подобран и применен на практике оригинальный набор олигонуклеотидных праймеров, позволяющий проводить выявление РНК энтеровирусов методом ОТ-ПЦР с одновременной дифференциацией на 2 геногруппы по 5'-НТР генома. Новизна предложенного способа выявления и дифференциации энтеровирусов подтверждена патентом на изобретение № 2441917 от 10.02.2012. Способ используется при

проведении научно-исследовательской работы по мониторингу энтеровирусов в ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Акт внедрения от 25.09.13).

Впервые с использованием молекулярно-генетических методов исследования на примере г. Н. Новгорода показана частота обнаружения энтеровирусов у детей с ОКИ, которая составила 8,0% (2,6-18,2%), из них НПЭВ были выявлены в 7,0% случаев (2,3-15,0%).

Установлены нуклеотидные последовательности области VP1 генома 72-х новых изолятов НПЭВ, которые депонированы в GenBank под номерами JX139774 - JX139810, JX139812 - JX139815, JX139817 - JX139827, JX139835, JX139836, JX139841 - JX139844, JQ518447 - JQ518448, JQ518453, JQ518455, JN588564 - JN588567, что расширяет международную базу нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего белок капсида энтеровирусов.

Впервые охарактеризован пейзаж НПЭВ, обнаруженных у детей с ОКИ в Нижегородской области, представленный как минимум 29-ю типами вируса; показано их видовое распределение (ЭВ вида А - 37,3%, ЭВ вида В - 46,3% и ЭВ вида С - 16,4%). Впервые в г. Н. Новгороде идентифицирован ЭВ116.

Продемонстрирована генетическая гетерогенность вирусов КА2, КА16, КА9, ЕСНО6, которая выразилась в каждом случае существованием нескольких филогенетических групп с уровнем различий в нуклеотидных последовательностях области VP1 генома, составившим 4,3-21,5%.

Получены новые знания о генетическом разнообразии вируса Коксаки А22, который представлен двумя геновариантами с уровнем дивергенции нуклеотидных последовательностей области VP1 генома 8,5-13,2%, аминокислотных последовательностей - 5,4-9,8%.

Практическая значимость работы:

Материалы диссертации использованы при подготовке информационных и методических документов:

1. Информационно-методическое письмо «Пейзаж неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих среди населения ПФО» (письмо ФС Роспотребнадзора от 31.10.11 №01/13784-1-26).

2. Методические рекомендации «Молекулярно-генетические исследования при мониторинге энтеровирусной инфекции: III. Генотипирование энтеровирусов с использованием секвенирования области VP1 и 5'НТР генома», утвержденные на региональном уровне (письмо ФС Роспотребнадзора от 23.08.12 №01/9527-12-26).
3. Аналитический обзор «Энтеровирусы у детей с гастроэнтеритом». Рекомендован для использования в учреждениях Роспотребнадзора в разделе «Координационный центр профилактики полиомиелита и энтеровирусной (неполио) инфекции» (письмо ФЦГиЭ Роспотребнадзора от 20.12.11 №09ФЦ/6327 на №01/15759-1-26 от 14.12.11 ФС Роспотребнадзора).
4. Результаты исследований на энтеровирусы оперативно сообщались в инфекционный стационар и ежемесячно направлялись в Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области, где использовались в официальной статистике инфекционной заболеваемости в Нижегородской области (Акт внедрения 08/16051 от 25.09.13).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Энтеровирусы обнаруживаются у детей с ОКИ с частотой 2,6-18,0%, преимущественно в летне-осенние месяцы, достоверно чаще у детей в возрасте от 3 до 7 лет.
2. Пейзаж энтеровирусов, наблюдаемый у детей с ОКИ, включает вакцинные вирусы полиомиелита и множество генетически гетерогенных типов неполиомиелитных энтеровирусов видов А, В и С.
3. Вирус Коксаки А22 имеет как минимум два генетических варианта с уровнем дивергенции нуклеотидных последовательностей области VP1 генома 8,5-13,2%, аминокислотных последовательностей - 5,4-9,8%.

Апробация работы:

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- на научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире» (п. Оболенск, Московской области, 2009 г.).
- на научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», посвященной 90-летнему юбилею академика РАМН И.Н. Блохиной в рамках 12-го

международного медицинского форума «Модернизация здравоохранения – основа повышения качества и доступности медицинской помощи», Нижний Новгород, 19-21 апреля 2011 г., Н.Н., выставка «Медицина +».

- на IV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 26-28 марта 2012 г.
- на научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения», Региональное совещание «Программное обеспечение учета, анализа и контроля инфекционной заболеваемости в Приволжском федеральном округе» (в рамках 13-го международного медицинского форума «Стандарты и порядки медицинской помощи – основа повышения эффективности здравоохранения»), Нижний Новгород, 11 апреля 2012 г.
- на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты риска здоровью населения», г. Пермь, 16-18 мая 2012 г.
- на заседаниях Ученого Совета Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной и проблемных научно-практических семинарах института.
- на заседаниях Совета молодых ученых Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной.

Объем и структура диссертации:

Материалы диссертации изложены на 142 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 284 источника литературы отечественных и зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 19 рисунками и 10 таблицами.

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Диссертационная работа выполнена в качестве фрагментов двух научных тем Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной:

1. «Этиология вирусных кишечных инфекций у детей» (рег. № 01.2.003 12243) к договору с Роспотребнадзором № 82-Д от 31 декабря 2005 г. «Разработка

комплексных мероприятий по диагностике, профилактике, лечению и эпиднадзору за актуальными инфекциями» (2006-2010 гг.);

2. «Молекулярно-генетический мониторинг циркуляции энтеровирусов и вирусов, ассоциированных с острым гастроэнтеритом» (рег. № 01.2.011 75711 от 05.10.2011 г.), выполняемой в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011-2015 гг.).

На разных этапах в работе приняли участие Л.Н. Голицына, Л.Б. Луковникова, Н.В. Епифанова, О.В. Парфенова – автор приносит им искреннюю благодарность. Автор выражает глубокую признательность за неоценимую помощь в выполнении работы научному руководителю д.б.н., профессору Н.А. Новиковой.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали:

- 7539 образцов фекалий детей в возрасте до 17 лет, госпитализированных с первоначальным диагнозом ОКИ в инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода (ДИБ №8) в период 2006-2012 гг.
- 108 проб стула пациентов с ОКИ, заведомо положительных на наличие РНК ЭВ, госпитализированных в инфекционные стационары Нижегородской области в период 2010-2012 гг.
- 748 проб стула, собранных от условно здорового населения г. Нижнего Новгорода, из них 243 образца копроматериала взрослых людей в возрасте от 17 до 85 лет и 505 проб стула от детей в возрасте до 18 лет.
- Нуклеотидные последовательности генома энтеровирусов, представленных в базе данных GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]. Всего использовано 165 последовательностей.

РНК энтеровирусов выделяли методом высокосолевого очищения (патент №2313792) и с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» производства ФГУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению.

Для обнаружения кДНК ЭВ до 2011 г. использовали лабораторный вариант метода ОТ-ПЦР, который позволяет одновременно проводить выявление и дифференциацию ЭВ на геногруппы I и II по 5'-НТР генома (патент №2441917). Обнаружение кДНК ЭВ в период 2011-2012 гг. проводили с применением комплекта реагентов для ПЦР в режиме реального времени «АмплиСенс Enterovirus-FL», производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению. Для выявления кДНК полиовирусов (ПВ) использовали комплект реагентов для ПЦР «АмплиСенс Poliovirus-FL», производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению.

Для идентификации типа ЭВ методом секвенирования использовали универсальные для всех ЭВ праймеры, фланкирующие серотиповой участок VP1 [Nix, 2006]. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Определение первичной структуры кДНК осуществляли в автоматическом режиме на приборе ABI Prism 3130 и BeckmanCoulter GenomeLab™ GeXP, согласно рекомендациям производителя. Тип ЭВ устанавливали с использованием программы BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].

Выравнивание нуклеотидных последовательностей, вычисление эволюционных дистанций, построение филограмм и анализ выведенных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA 5 [Tamura, 2011]. Филогенетические деревья строили методом объединения ближайших соседей (Neighbor-joining) с использованием двухпараметрической модели Kimura. Достоверность топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик (bootstrapreplicates). На филограммах указывали индексы поддержки более 70.

Статистическую обработку осуществляли общепринятым методом с помощью компьютерной программы BioStat 2008.

Результаты и их обсуждение

1 Выявление энтеровирусов у детей, госпитализированных с ОКИ

Разработан способ выявления и одновременной дифференциации энтеровирусов человека на геногруппы по 5'-НТР генома, что было обусловлено

отсутствием к моменту начала исследования доступных тест-систем для детекции РНК энтеровирусов. Способ основан на проведении ПЦР кДНК генома представителей рода *Enterovirus* с использованием оригинальных дифференцирующих, специфичных в отношении геногруппы праймеров, соответствующих консервативным участкам 5'-НТР генома ЭВ геногруппы I (ЭВ вида А и В) и ЭВ геногруппы II (ЭВ вида С и D), и амплифицирующие фрагменты генома размером 251 п.н. для ЭВ геногруппы I и 295 п.н. – для ЭВ геногруппы II. Данные праймеры были сконструированы на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генома 152 штаммов энтеровирусов человека, 5 штаммов энтеровирусов животных и 21 штамма других пикорнавирусов (парэхо-, кобу-, афто-, кардиовирусы, вирус гепатита А), имеющих значение в инфекционной патологии человека. Теоретическая специфичность олигонуклеотидов была подтверждена экспериментально на пробах, содержащих РНК референтных штаммов ЭВ геногрупп I (ЕСНО30) и II (вакцинный полиовирус типа 1), вируса гепатита А и парэховируса человека I типа.

При исследовании 7539 образцов фекалий детей в возрасте до 17 лет, госпитализированных с ОКИ в инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода в период 2006-2012 гг. ЭВ обнаружены у 595 детей, что составило $8,0 \pm 0,3\%$ ($2,6 \pm 0,4 - 18,2 \pm 1,4\%$ в разные годы).

Выявленные ЭВ ретроспективно и в текущем режиме были дифференцированы на ПВ и НПЭВ. Частота обнаружения вакцинных полиовирусов составила $1,0 \pm 0,1\%$ ($0,07 \pm 0,07 - 4,1 \pm 0,9\%$). Все ПВ идентифицированы у детей с указанием на недавнюю вакцинацию ОПВ и были направлены в Национальную лабораторию по диагностике полиомиелита (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН).

Частота обнаружения НПЭВ в изучаемый период времени в среднем составила $7,0 \pm 0,3\%$ ($2,3 \pm 0,4 - 15,0 \pm 1,3\%$), соответственно. В совместной работе с к.б.н. Епифановой Н.В. установлена доля энтеровирусной (неполио) инфекции в структуре вирусных ОКИ, составившая $11,5 \pm 0,5\%$. Часто НПЭВ были ассоциированы с вирусами кишечной группы, в большинстве случаев с рота- и норовирусами. Более чем в половине случаев зафиксирована моноэнтеровирусная инфекция (рис. 1). Наличие моноэнтеровирусной инфекции, сопровождающейся симптомами поражения

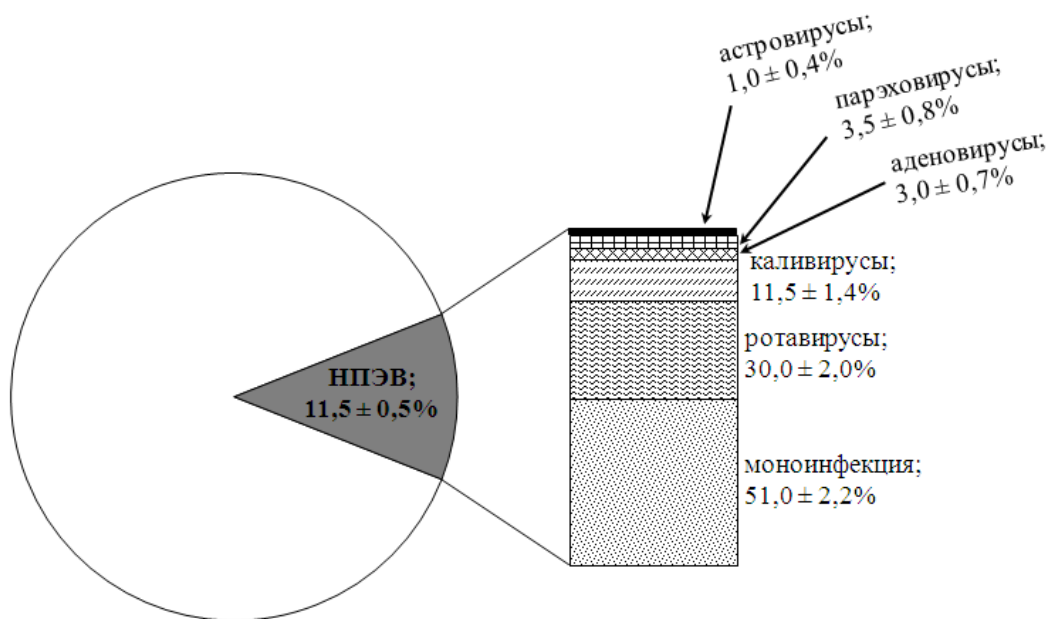


Рис.1. Доля энтеровирусной (неполио) инфекции в структуре вирусных ОКИ в г. Нижнем Новгороде и распределение НПЭВ, обнаруженных при микст- и моноэнтеровирусной инфекции

желудочно-кишечного тракта, не только подтверждает способность ЭВ вызывать диарейные заболевания, но и может указывать на причину ОКИ у обследованных больных.

Для оценки частоты обнаружения ЭВ среди условно здорового населения г. Н. Новгорода в разные годы было обследовано 748 лиц разного возраста. ЭВ были выявлены у обследуемых контингентов в период 2006-2007 гг., когда на территории г. Н. Новгорода был зафиксирован эпидемический подъем заболеваемости ЭВ-СМ. В 2006 году (год, предшествовавший эпидемическому подъему заболеваемости СМ), проведено обследование 222 клинически здоровых детей разного возраста. ЭВ были выявлены в 12 случаях, что составило $5,4 \pm 1,5\%$. В это время частота обнаружения ЭВ у детей с ОКИ была равна $13,7 \pm 1,6\%$, $p < 0,001$. В 2007 году частота обнаружения ЭВ у детей, госпитализированных с ОКИ, составила $18,2 \pm 1,4\%$, однако обследование здоровых детей в это время не проводилось. В тоже время у взрослых ЭВ были обнаружены в $17,6 \pm 6,5\%$ случаев, что свидетельствует об активной циркуляции ЭВ среди населения в период эпидемического подъема заболеваемости СМ. В последующие годы, на фоне снижения заболеваемости ЭВИ, ЭВ не были обнаружены ни у детей, ни у взрослых.

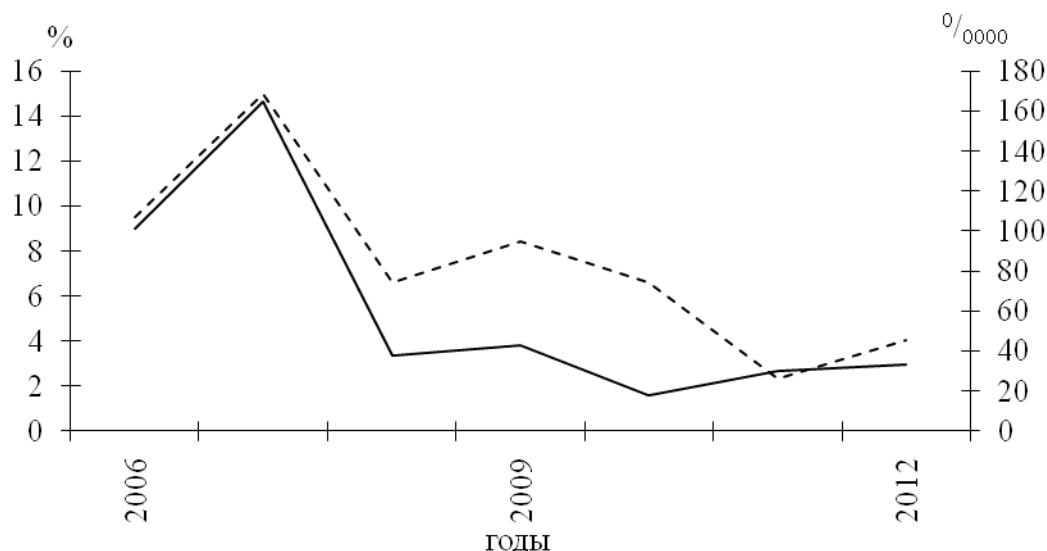


Рис. 2. Многолетняя (семилетняя) динамика частоты обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ (-----) и динамика заболеваемости ЭВ-СМ (—) и в г. Н. Новгороде в 2006-2012 гг. (по контингенту до 14 лет).

На следующем этапе работы проанализирована частота обнаружения НПЭВ в течение семи эпидемических сезонов (рис. 2). Установлено, что данный показатель в разные годы колебался от $2,3 \pm 0,4\%$ до $15,0 \pm 1,3\%$, при этом в месяц пика (июнь) частота обнаружения НПЭВ может достигать $43,0 \pm 7,6\%$. Представляло научный интерес сравнить многолетнюю динамику частоты обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ и динамику заболеваемости ЭВ-СМ. Показано, что увеличение частоты выявления НПЭВ при ОКИ в 1,6 раза в 2007 г., по сравнению с 2006 г., совпало с активизацией эпидемического процесса ЭВ-СМ, который был зафиксирован в августе-октябре 2007 г. и обусловлен НПЭВ 9-ти серотипов. Высокий процент обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ в 2006 г. и относительно низкий показатель заболеваемости ЭВ-СМ в том же году может свидетельствовать о том, что уже в период, предшествующий эпидемическому подъему заболеваемости ЭВ-СМ, наблюдалась активизация циркуляции среди населения высокопатогенных НПЭВ. В последующие годы на фоне снижения заболеваемости ЭВ-СМ наблюдалось и достоверное ($p < 0,001$) снижение частоты обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ, которая в 2011 г. достигла своего минимального значения, равного $2,3 \pm 0,4\%$. Однако уже в 2012 г. произошел достоверный ($p < 0,05$) рост этого показателя в 1,7 раза и составил $4,0 \pm 0,6\%$. Одновременно с этим наметился и подъем заболеваемости ЭВ-СМ,

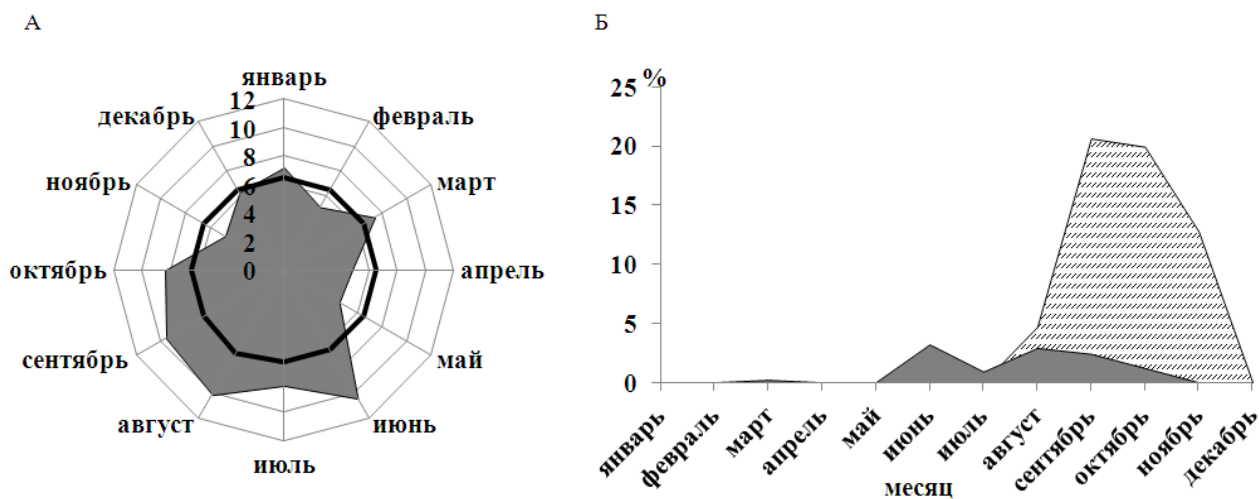


Рис. 3. Помесячная частота обнаружения (%) НПЭВ у детей с ОКИ в возрасте до 17 лет в г. Нижнем Новгороде в 2006-2012 гг. (А) и ее сравнение с аналогичным показателем у детей с клиникой СМ (Б).

■ Годовая динамика — Среднегодовой уровень ▨ ЭВ-СМ ■ ОКИ

показатель которой по данным официальной статистики в 2012 г. достиг значения $33,04^0/0000$.

С целью изучения сезонных особенностей циркуляции НПЭВ среди детей с ОКИ рассчитана среднееголетняя месячная частота их обнаружения (рис. 3А). Установлено, что НПЭВ выявлялись ежемесячно, преимущественно в летне-осенний период с пиком частоты обнаружения в июне (10,4%). Анализ вирус-вирусных ассоциаций, проведенный в данном исследовании, показал, что во время сезонной циркуляции ЭВ возрастает доля моноэнтеровирусной инфекции, которая на пике частоты обнаружения может достигать 51,1%. Зафиксировано незначительное увеличение частоты обнаружения НПЭВ в январе и марте, составившей 7,2% и 7,4%, соответственно. Установлено, что этот подъем был обусловлен ассоциацией НПЭВ с другими вирусами кишечной группы. Сравнительный анализ среднееголетних данных месячного выявления НПЭВ у детей с клиникой ОКИ и ЭВ-СМ показал, что увеличение частоты обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ предшествует сезонному подъему заболеваемости СМ, что может иметь прогностическое значение (рис. 3Б).

Проанализирована частота обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ разного возраста. Было выделено три возрастные группы детей: до 3 лет, от 3 до 7 лет и старше 7 лет. Установлено, что НПЭВ достоверно чаще выявлялись у детей в

возрасте от 3 до 7 лет ($8,4 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$). Частота обнаружения НПЭВ у детей до 3 лет составила $6,6 \pm 0,4\%$, а в возрастной группе «старше 7 лет» - $6,0 \pm 0,7\%$. При анализе распределения больных ОКИ, выделявших НПЭВ, на три возрастные группы установлено, что наиболее поражаемой оказалась группа детей в возрасте до 3 лет ($57,6 \pm 2,2\%$, $p < 0,001$). Анализ возрастного распределения детей, выделявших ЭВ, показал наличие различий в частоте обнаружения НПЭВ в возрастных группах детей в разные годы. Так, в 2006 г. НПЭВ достоверно чаще выявлялись у детей в возрасте до 3 лет ($12,0 \pm 1,9\%$, $p < 0,01$), по сравнению с детьми в возрасте от 3 до 7 лет ($4,1 \pm 1,8\%$). Однако в 2007 г. возрастная структура детей, выделявших ЭВ, изменилась и НПЭВ достоверно чаще обнаруживались у детей в возрасте от 3 до 7 лет ($22,5 \pm 3,1\%$, $p < 0,01$), по сравнению с детьми младшего возраста ($12,1 \pm 1,5\%$). Начиная с 2008 г. на фоне снижения частоты выявления НПЭВ у детей с ОКИ наблюдалось и отсутствие доминирующей возрастной группы.

Таким образом, впервые в Российской Федерации с использованием молекулярно-генетических методов исследования установлена частота обнаружения ЭВ у детей с диареей в г. Нижнем Новгороде, которая составила $8,0\%$ ($2,6-18,2\%$), из них НПЭВ были выявлены в $7,0\%$ случаев ($2,3-15,0\%$), в том числе в $51,0\%$ случаев при моноинфекции. НПЭВ выявлялись ежемесячно преимущественно в летне-осенние месяцы с пиком частоты обнаружения в июне ($10,4\%$, $4,1-43,0\%$), опережая подъем заболеваемости серозным менингитом, достоверно чаще у детей в возрасте от 3 до 7 лет ($8,4 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что группа детей с диареей может быть значима для мониторинга циркуляции ЭВ наряду со здоровыми и больными нейроинфекциями детьми.

2 Спектр типов и видовое распределение неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у детей с ОКИ

С целью изучения спектра типов ЭВ, идентифицированных у больных ОКИ детей, госпитализированных в инфекционные стационары Нижнего Новгорода в 2006-2012 гг. и Нижегородской области в 2010-2012 гг., проведено типирование выявленных НПЭВ с использованием метода секвенирования серотипового участка (2602-2977 н.о. по геному ПВ1 штамм Mahoney) гена VP1 ЭВ размером 376 п.н. Тип вируса установлен в 134 случаях (у 84 детей из г. Нижнего Новгорода и у 50

пациентов из Нижегородской области). Сравнительный анализ спектров ЭВ, выявленных у детей с ОКИ в Нижнем Новгороде и Нижегородской области в период 2010-2012 гг. показал незначительные различия в типовом разнообразии НПЭВ, что позволило объединить результаты типирования. Всего идентифицировано 29 серотипов (табл. 2). Нуклеотидные последовательности 25 типов НПЭВ (вирусы Коксаки А2, А4, А5, А6, А10, А16, ЭВ76; Коксаки А9, В2, В4, В5, вирусы ЕСНО типов 3, 4, 6, 9, 16, 18, 25, 30; Коксаки А1, А19, А20, А22, А24 и ЭВ116) депонированы в GenBank.

Спектр включал, во-первых, энтеровирусы – признанные этиологические агенты серозного менингита. Так, в 2007 г., т.е. период эпидемического подъема заболеваемости ЭВ-СМ, обусловленного НПЭВ 9-ти серотипов (Е30, Е7, Е18, Е13, Е9, КВ5, КА1, КА9, КА13) в фекалиях детей, больных ОКИ, были обнаружены вирусы ЕСНО типов 7, 18 и 30. Однако в последующие годы эти серотипы вирусов, а так же ЕСНО 3, 4, 9, 11, 16 и 25, обнаруживались в единичных случаях. Во время сезонного подъема заболеваемости ЭВ-СМ в 2007 г. у больных ОКИ были так же идентифицированы вирусы Коксаки А9, обнаруженные в нашем исследовании в 9,0% случаев, при этом вирус был обнаружен как при моно-, так и при микстинфекции. ЕСНО6 до 2011 г. не обнаруживался у обследуемых детей, однако уже в 2011-2012 гг. он был одним из самых часто встречаемых вирусов (8,2%). Вирусы Коксаки В – являющиеся основными этиологическими агентами миокардита и часто встречающиеся так же при ЭВ-СМ, были идентифицированы нами у детей с ОКИ в 2009-2012 гг. в 2,2-3,0% случаев. Наиболее часто встречаемым среди них был вирус Коксаки В5.

Во-вторых, спектр типов НПЭВ включал вирусы, наиболее часто ассоциируемые с герпангиной и экзантемой полости рта и конечностей. Так, вирус КА16 выявлялся нами практически ежегодно, примерно в одинаковом числе случаев при микст- и моноинфекции. Стоит отметить, что он был обнаружен и у здорового ребенка. Вирусы Коксаки А2, А4, А5 и А6, так же часто встречаемые при ящуроподобном заболевании и герпангине, были идентифицированы нами у детей с ОКИ в 9,7%, 6,0%, 3,7% и 5,2%, соответственно. Данные вирусы выявлены в большинстве случаев при моноинфекции, что дает основание предположить их возможную роль в возникновении ОКИ у обследованных детей.

Таблица 2

Спектр типов НПЭВ, выявленный у детей с ОКИ в г. Н. Новгороде и Нижегородской области в 2006-2012 гг.

Вид	Тип	Годы							Всего	
		2006	2007	2008	2009	2010*	2011*	2012*	абс.	%
1.	КА2			2	1	0/2	4/3	0/1	13	9,7
2.	КА4				1	3/1	2/0	1/0	8	6,0
3.	КА5		1		1	2/0	1/0		5	3,7
4.	КА6					3/1		0/3	7	5,2
5.	КА10						0/1	0/1	2	1,5
6.	КА16	1	2	1		1/0	2/4	1/1	13	9,7
7.	ЭВ76						0/1	0/1	2	1,5
8.	КА9		1	1		2/2	4/2		12	9,0
9.	КВ1						0/1	2/0	3	2,2
10.	КВ2				1	1/0		1/0	3	2,2
11.	КВ3						1/0	1/1	3	2,2
12.	КВ4					1/2	1/0		4	3,0
13.	КВ5					4/0			4	3,0
14.	Е3					1/0	1/1		3	2,2
15.	Е4						2/0		2	1,5
16.	Е6						0/7	1/3	11	8,2
17.	Е7		1						1	0,8
18.	Е9					0/2	0/1		3	2,2
19.	Е11							1/1	2	1,5
20.	Е16			1					1	0,8
21.	Е18		1			0/1	0/2	1/0	5	3,7
22.	Е25					1/0	1/0		2	1,5
23.	Е30		2		1				3	2,2
24.	КА1		1	1		0/1			3	2,2
25.	КА19			2					2	1,5
26.	КА20					1/0			1	0,8
27.	КА22		2	1		3/1	1/1		9	6,7
28.	КА24				1				1	0,8
29.	ЭВ116			1	1	2/0	1/0	0/1	6	4,5
Итого		1	11	10	7	25/13	21/24	9/13	134	100

* Нижний Новгород/Нижегородская область

В-третьих, идентифицированный у детей с ОКИ вирусный спектр включал НПЭВ, часто обнаруживаемые в других исследованиях при диарейных заболеваниях. Так, вирус Коксаки А22 идентифицирован нами в 6,7% случаев, при этом в 67,0% он был выявлен при моноэнтеровирусной инфекции. Вирусы КА1 и КА19 выявлялись в небольшом проценте случаев (2,2% и 1,5%, соответственно), а КА20 и КА24 были идентифицированы нами в единичных случаях (0,8%).

В 2008-2011 гг. в Н. Новгороде была выявлена группа НПЭВ, у которых различие в нуклеотидной последовательности серотиповой области VP1 генома со всеми известными типами превысило 25%. Для установления серотипа этих вирусов мы обратились за помощью в Международный комитет по таксономии вирусов [www.picornastudygroup.com]. Все нижегородские НПЭВ данной группы были признаны вариантами нового, открытого российскими исследователями ЭВ116 [Lukashev, 2012]. Вирусы данного типа выявлялись в пробах фекалий детей с ОКИ практически ежегодно, при этом наиболее часто в микстинфекции с другими вирусами кишечной группы.

Методом частичного секвенирования генома были исследованы 11 НПЭВ, выявленных у здоровых детей в г. Н. Новгороде в 2006 г. Идентифицированы два серотипа ЭВ: Коксаки А8 и А16. Следует отметить, что КА8 не обнаружен у детей с диареей.

На основе полученных знаний о типовом составе выявленных НПЭВ проведена оценка их относительного видового распределения. Установлено, что на долю ЭВ вида А приходится $37,3 \pm 4,2\%$, на ЭВ вида В – $46,3 \pm 4,3\%$ и на ЭВ вида С – $16,4 \pm 3,2\%$. Анализ вирус-вирусных ассоциаций показал, что достоверно чаще ЭВ вида А ($p < 0,01$) и В ($p < 0,001$) выявляются при моноэнтеровирусной инфекции, тогда как НПЭВ вида С - примерно в одинаковом количестве случаев при моно- и микстинфекции. Применение молекулярно-генетических методов исследования позволило идентифицировать в высоком проценте случаев НПЭВ вида А и С, циркуляция которых была ранее недооценена во всем мире, поскольку вирусы Коксаки А плохо реплицируются в культуре ткани и их обнаружение и серотипирование с использованием культуральных методов было весьма затруднительно.

Таким образом, у детей с ОКИ в Нижегородской области в 2006-2012 гг. идентифицировано 29 типов НПЭВвидов А ($37,3 \pm 4,2\%$), ЭВ-В ($46,3 \pm 4,3\%$) и ЭВ-С ($16,4 \pm 3,2\%$). Выявлены вирусы, наиболее часто выявляемые при СМ (Коксаки А9; Коксаки В3, В5; ЕСНО 6, 7, 11, 18, 30), при ящуроподобном заболевании и герпангине (Коксаки А2, А4, А5, А6, А16), а так же энтеровирусы, претендующие на этиологическую роль в возникновении диарейного заболевания (Коксаки А1, А19, А20, А22, А24). Впервые у детей с ОКИ в г. Н. Новгороде обнаружен ЭВ116.

Полученные результаты свидетельствуют о значимости обследования детей с ОКИ в эпидемиологическом надзоре для установления наиболее полного спектра типов ЭВ, циркулирующих среди населения.

3 Генетическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у детей с ОКИ и при других формах энтеровирусной инфекции

3.1 Энтеровирусы вида А

Среди ЭВ вида А наиболее часто встречаемыми были вирусы Коксаки А2 и А16, при этом на долю каждого пришлось по 26%. На рисунке 4 видно, что идентифицированные в 2006-2012 гг. у больных диареей вирусы **Коксаки А16** кластеризовались вместе с вирусами, принадлежащими к генотипу В линии В2 (согласно предложенной классификации [Perera, 2007; Zong, 2011; Zhang, 2010]), и отличались от прототипного штамма G-10 не более чем 24,7%, что на молекулярном уровне подтверждает серотип изучаемых клинических изолятов вируса. Нижегородские вирусы Коксаки А16 распределились по 4-м филогенетическим группам. Уровень различий между геновариантами составил не менее 4,3%. Гомология нуклеотидных последовательностей участка гена VP1 внутри рассматриваемых групп более 95,2%.

Нуклеотидные последовательности фрагмента VP1 генома клинических изолятов вируса Коксаки А16, выявленных у детей с ОКИ в Нижнем Новгороде и Нижегородской области в 2011-2012 гг., у больного СМ в Вологде в 2011 г. и в сточной воде из г. Чебоксары в 2012 г., значительно отличались от соответствующих последовательностей зарубежных штаммов (не менее 11,2%) и сформировали самостоятельный кластер 4. Уровень гомологии внутри группы превышал 95,2%.

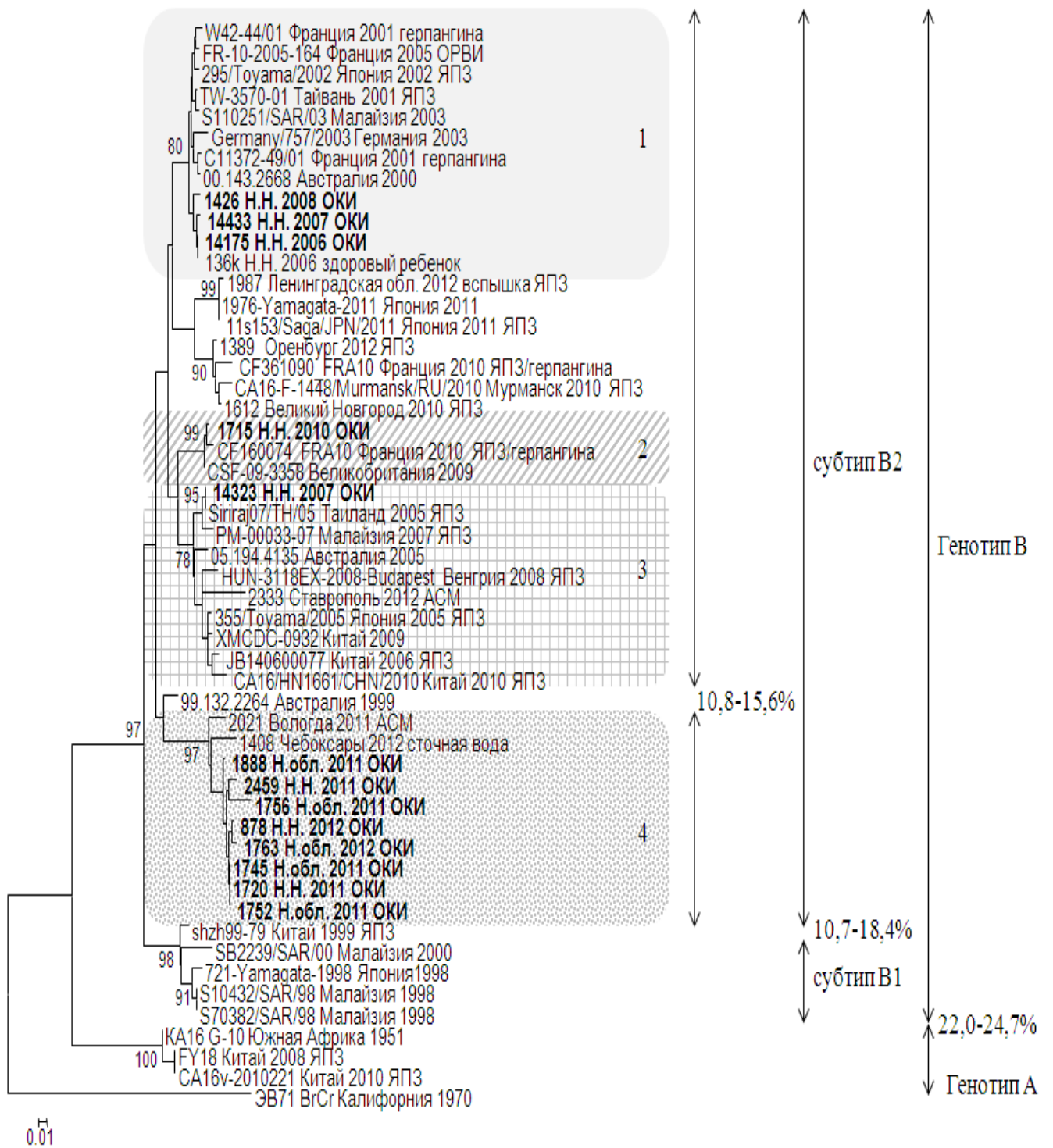


Рис. 4. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 (376 п.н.) KA16. Нижегородские KA16, выявленные у детей с ОКИ, отмечены жирным шрифтом. Нуклеотидная последовательность прототипного штамма ЭВ71 BrCr использована в качестве внешней группы.

ЯПЗ – ящуроподобное заболевание

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

Стоит отметить, что вирусы данной группы отличались от других нижегородских КА16 (кластеры 1, 2 и 3) по нуклеотидным последовательностям серотипового участка гена VP1 более чем на 10,8%. Такой высокий уровень дивергенции может служить основанием для выделения этих вирусов в отдельный генотип КА16 или субтип внутри генотипа В, что требует дополнительных исследований. Установлено близкое филогенетическое родство (гомология более 97%) исследованных КА16 с зарубежными штаммами, выявленными при герпангине и ящуроподобном заболевании.

Нуклеотидные последовательности вируса **Коксаки А2** распределились на пять филогенетических групп с уровнем дивергенции более 11,6% (рис. 5). Идентифицирован вариант КА2 (кластер 5: КА2/1290 и КА2/1294), у которого гомология нуклеотидных последовательностей области VP1 генома с прототипным штаммом Fleetwood, выделенном в 1947 г. в Делавэре от больного паралитическим заболеванием, составила 22,0-23,1%. Установлена высокая степень гомологии (более 94,0%) нуклеотидных последовательностей КА2, выявленных у детей с ОКИ, с вирусами, идентифицированными у здоровых детей и больных ОРВИ, герпангиной, ЭВ-СМ как на территории РФ, так и в Европе и странах Тихоокеанского региона.

3.2 Энтеровирусы вида В

В нашем исследовании у детей с ОКИ ЭВ-В были выявлены в наибольшем проценте случаев, при этом самыми часто встречаемыми среди них были вирусы КА9 (19,4%) и ЕСНО6 (17,7%).

Вирус Коксаки А9 представлен двумя генетическими вариантами (рис. 6). Один вариант вируса выявлен в 2007 г. и в последующие годы уже не определялся у больных ОКИ. Основная масса нижегородских КА9 сформировала собственную ветвь на филограмме с уровнем статистической поддержки узла 98,0%. Кластер образован прежде всего вирусами, выявленными в 2010-2011 гг., с достаточно высоким уровнем гомологии (96,2-100,0%), что может свидетельствовать о циркуляции на территории Нижегородской области в этот двухлетний период одного геноварианта вируса. Стоит отметить, что данные вирусы были филогенетически близки КА9, выявленным в те же года у больных СМ в Нижнем Новгороде и Нижегородской области (гомология более 94,4%), а так же к вирусам, выделенным на других территориях РФ и

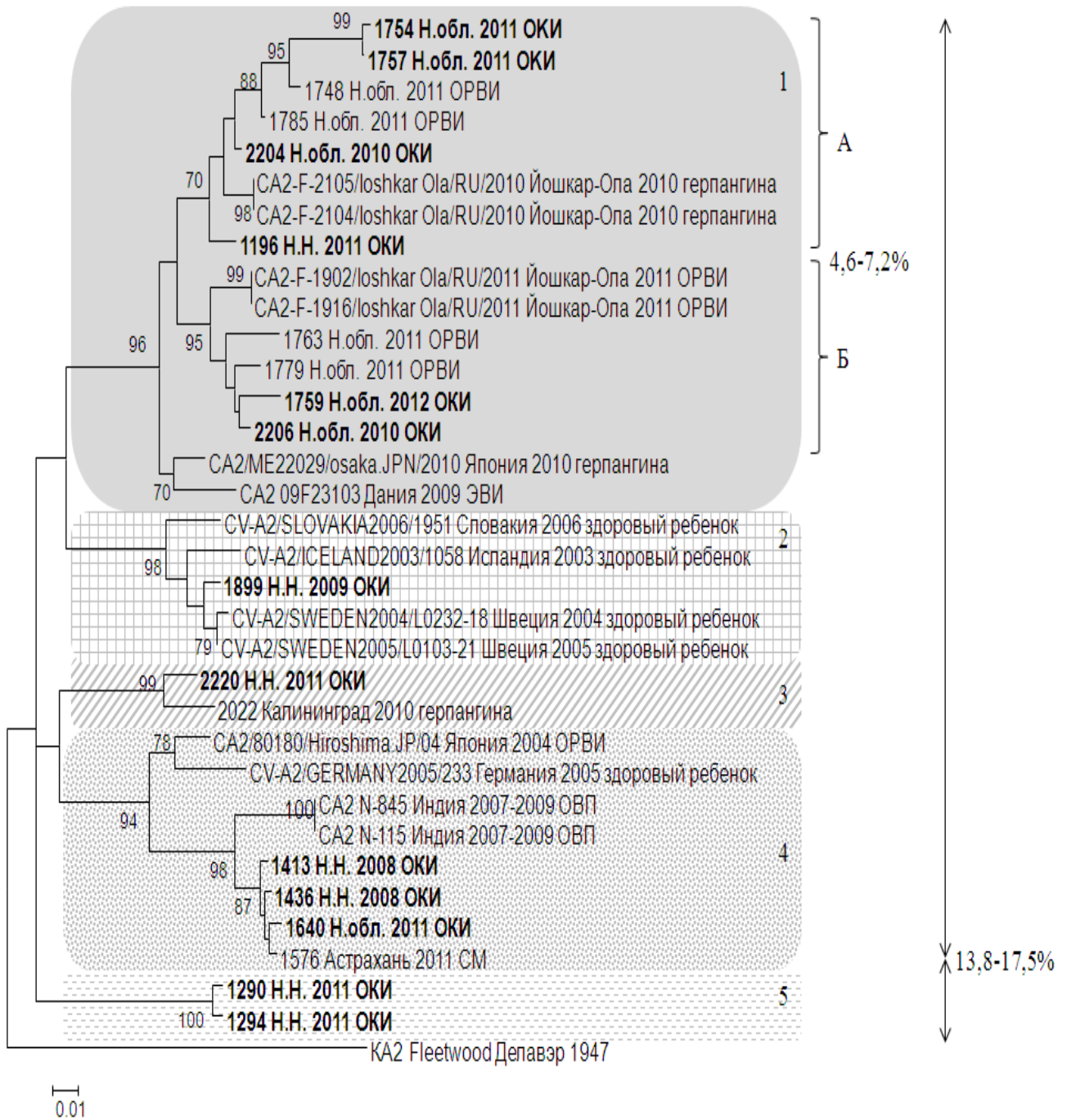


Рис. 5. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 (376 п.н.) KA2. Нижегородские KA2, выявленные у детей с ОКИ, отмечены жирным шрифтом.

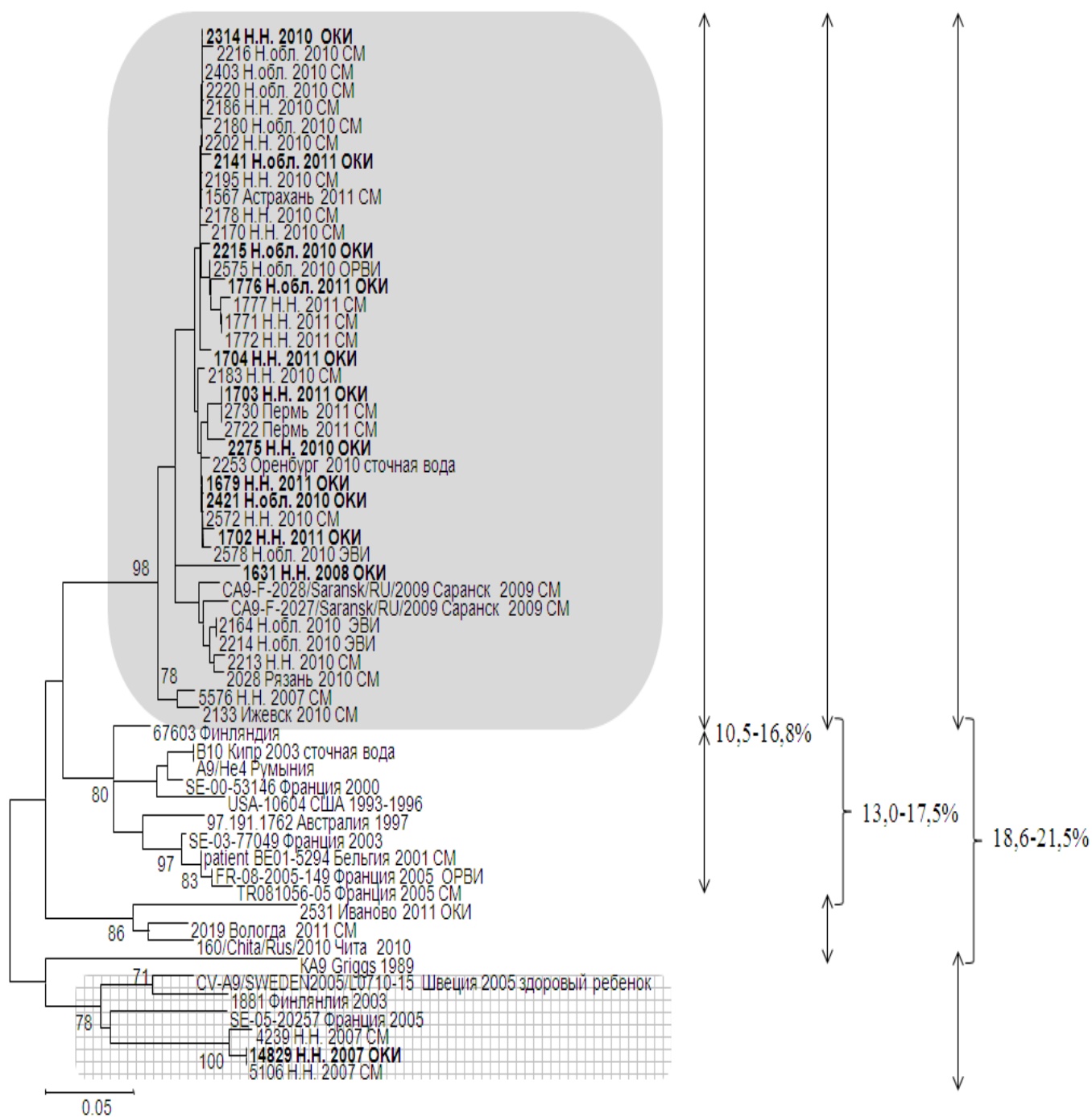


Рис. 6. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1 гена (376 п.н.) **КА9**. Нижегородские КА9, выявленные у детей с ОКИ, отмечены жирным шрифтом.

значительно отличались от наиболее близких зарубежных штаммов КА9 (не менее 10,5% дивергенции).

Вирус ЕСНОсформировал три филогенетические группы с уровнем отличий по нуклеотидным последовательностям серотипового участка гена VP1 - 9,3-16,6%

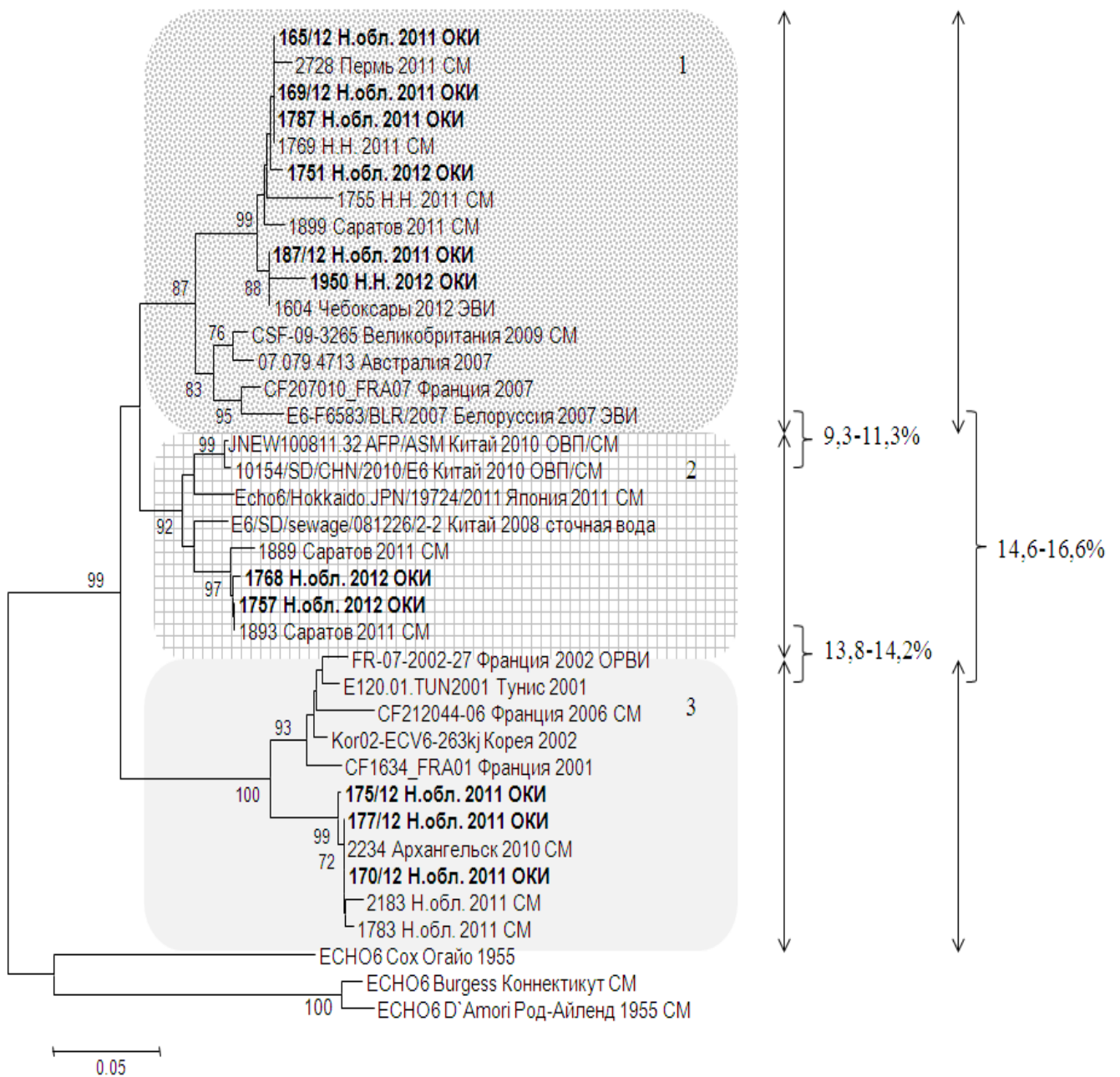


Рис. 7. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 (376 п.н.) ЕСНО6. Нижегородские ЕСНО6, выявленные у детей с ОКИ, отмечены жирным шрифтом.

(рис. 7). Гомология нуклеотидных последовательностей в пределах каждой группы составила более 96,4%. ЕСНО6, выявленные у детей с диареей, проявили высокую степень гомологии с вирусами, выявленными в те же года у больных ЭВ-СМ в Нижнем Новгороде и Нижегородской области и на ряде территорий РФ (гомология превышала 94,0%) и отличались от наиболее близких зарубежных штаммов более чем на 5,0%.

3.3 Неполиомиелитные энтеровирусы вида С

В нашем исследовании среди ЭВ вида С наиболее часто встречаемым вирусом был Коксаки А22 (41%). В настоящее время очень мало известно о его циркуляции и филогенетических связях. В базе данных GenBank доступно только 4 полные нуклеотидные последовательности генома этого вируса, что затрудняет проведение филогенетического анализа. Скудная представленность современных штаммов этих вирусов в базе данных GenBank ограничивает так же проведение глобального филогенетического анализа с целью установления генотипов этих вирусов.

На рисунке 8 видно, что все нижегородские варианты вируса КА22 кластеризуются с прототипным штаммом Chulman, выделенном в Нью-Йорке в 1955 г. Однако гомология нуклеотидных последовательностей не превышала 70,0%, что по всей вероятности объясняется значительным интервалом между временем выделения Chulman и нижегородских КА22 (более 50 лет). Гомология со штаммами BAN/2007/14690, выделенном в Бангладеше в 2007 г., и 438913, выявленном в Гонг Конге в 2010 г., не превышала таковой с прототипным штаммом Chulman. С остальными штаммами, идентифицированными в США в 1975 г. и в Бангладеше в 1999 и 2008 гг., нижегородские КА22 проявили большее филогенетическое родство, и отличия в нуклеотидных последовательностях не превышали 18,0%. Стоит отметить, что выявленные в Нижнем Новгороде в 2010-2012 гг. вирусы проявили высокую степень гомологии (95,0- 99,3%) с КА22, обнаруженными в те же года у больных ЭВИ в Нижегородской области.

На филограмме видно, что нижегородские вирусы КА22 сформировали два временных генетических кластера (кластер 1 – вирусы, выявленные в 2007-2008 гг. и кластер 2 – вирусы, циркулировавшие в 2010-2012 гг.). Уровень дивергенции между кластерами составил 8,5-13,2%, а внутри групп не превышал 5%. При анализе аминокислотных последовательностей фрагмента VP1 расхождение между кластерами составило 5,4-9,8%. Установлено наличие двух аминокислотных замен, характерных для вирусов, выявленных в 2007-2008 гг. (Т93А, S139Т), и три замены аминокислот (R64К, L119М и F138Y) у вирусов, циркулировавших в 2010-2012 гг. Обнаруженные различия в аминокислотных последовательностях нижегородских вирусов Коксаки А22 свидетельствуют о наличии двух происхождений этого вируса.

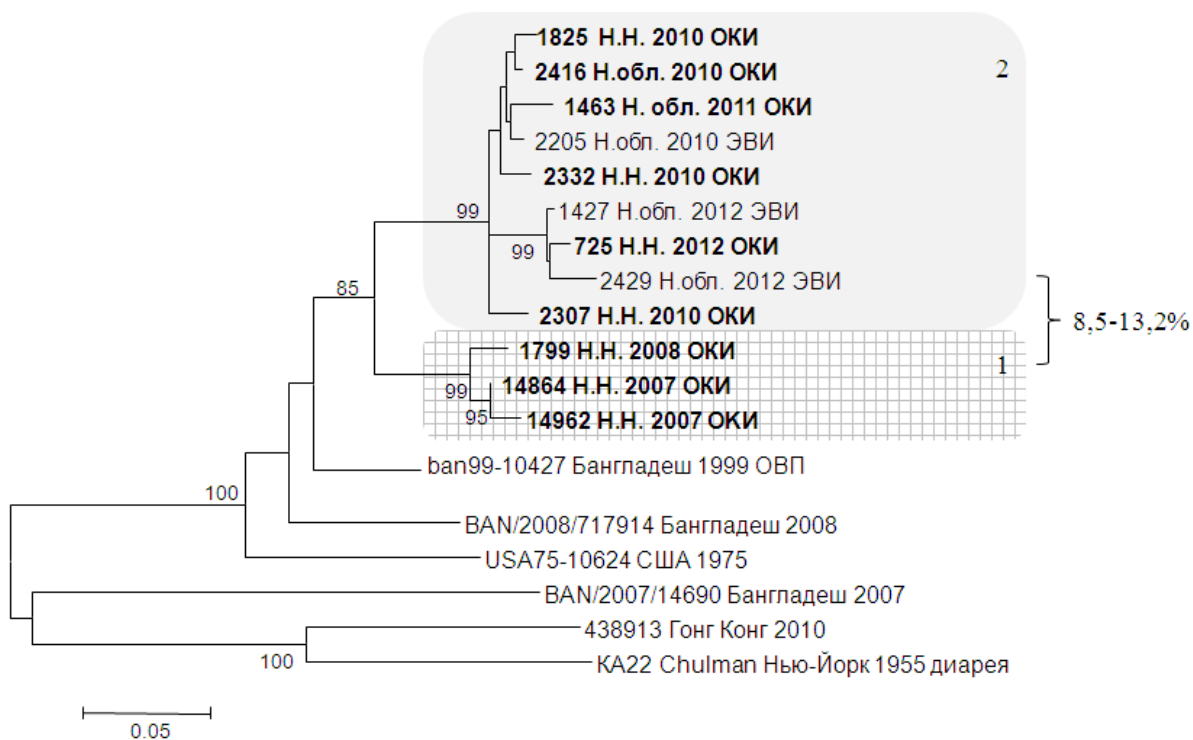


Рис. 8. Филограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 (376 п.н.) **KA22**. Нижегородские KA22, выявленные при ОКИ, отмечены жирным шрифтом.

Таким образом, наиболее часто встречающиеся у детей с диареей НПЭВ характеризуются генетическим разнообразием, которое проявляется наличием нескольких филогенетических групп. Идентифицированные у детей с ОКИ НПЭВ проявили высокую степень гомологии со штаммами, выявленными при других формах ЭВИ. Дана молекулярно-генетическая характеристика вируса Коксаки A22, свидетельствующая о наличии двух происхождений этого вируса.

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что в результате проведенной работы с использованием молекулярно-генетических методов исследования, в том числе авторской методики, охарактеризован пейзаж ЭВ у детей с ОКИ, который включал вакцинные ПВ и НПЭВ 29-ти серотипов, относящихся к видам А, В и С. Идентифицированы вирусы, наиболее часто выявляемые при СМ (Коксаки А9; Коксаки В3, В5; ЕСНО 6, 7, 11, 18, 30), при ящуроподобном заболевании и герпангине (Коксаки А2, А4, А5, А6, А16), а так же энтеровирусы, претендующие на этиологическую роль в возникновении диарейного заболевания (Коксаки А1, А19, А20, А22, А24). Охарактеризовано генетическое разнообразие вирусов Коксаки А2,

A16, A9, ЕСНО6 и Коксаки A22. Полученные результаты свидетельствуют о значимости обследования детей с ОКИ в эпидемиологическом надзоре за ЭВИ в части слежения за циркуляцией ЭВ наряду со здоровыми и больными нейроинфекциями детьми и объектов окружающей среды, а так же расширяют представление генетической гетерогенности НПЭВ, и вносят вклад в мировую базу нуклеотидных последовательностей генома ЭВ.

ВЫВОДЫ

1. С использованием молекулярно-генетических методов исследования, на большой выборке обследуемых установлена частота обнаружения у детей с острой кишечной инфекцией энтеровирусов ($8,0 \pm 0,3\%$; $2,6 \pm 0,4 - 18,2 \pm 1,4\%$), неполиомиелитных энтеровирусов ($7,0 \pm 0,3\%$; $2,3 \pm 0,4 - 15,0 \pm 1,3\%$).
2. Установлено, что энтеровирусы у детей с диареей выявляются круглогодично преимущественно в летне-осенние месяцы с пиком частоты обнаружения в июне ($10,4\%$; $4,1 \pm 2,3 - 43,0 \pm 7,6\%$) во всех возрастных группах, достоверно чаще у детей в возрасте от 3 до 7 лет ($8,4 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$).
3. Охарактеризован спектр неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у детей с острой кишечной инфекцией в г. Нижнем Новгороде и Нижегородской области в 2006-2012 гг., представленный 29-ю типами, относящихся к энтеровирусам вида А (КА типов 2, 4-6, 10, 16, ЭВ76; $37,3 \pm 4,2\%$), энтеровирусам вида В (КА9, КВ типов 1-5, ЕСНО типов 3, 4, 6, 7, 9, 11, 16, 18, 25, 30; $46,3 \pm 4,3\%$) и энтеровирусам вида С (КА типов 1, 19, 20, 22, 24, ЭВ116; $16,4 \pm 3,2\%$).
4. Показана генетическая гетерогенность вирусов Коксаки A2, A16, A9, ЕСНО6 и КА22, которая в каждом случае выразилась существованием нескольких филогенетических групп с уровнем различий в нуклеотидных последовательностях области VP1 генома, составившим 4,3-21,5%.
5. Впервые показано существование у вируса Коксаки A22 двух геновариантов с уровнем дивергенции нуклеотидных последовательностей области VP1 генома 8,5-13,2% и 5,4-9,8% аминокислотных последовательностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Онищенко Г. Г. Сезон энтеровирусного серозного менингита в Нижнем Новгороде в 2007 году: молекулярно-эпидемиологические аспекты / Г. Г.

- Онищенко, Е. И. Ефимов, Н. А. Новикова, О. Н. Княгина, Е. Ю. Петров, Д. В. Новиков, Л. Н. Голицына, Т. В. Осипова, И. Н. Окунь, Н. А. Калашникова, Д. А. Липшиц, Е. В. Грачева, Н. В. Епифанова, Л. Л. Климова, Л. Б. Луковникова, **С. Г. Фомина**, В. И. Ершов, Л. В. Погодина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2009. - №2. - С.24-30.
2. **Фомина С.Г.** Видовое разнообразие энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде / **С.Г. Фомина**, Л.Н. Голицына, Н.В. Епифанова, О.В. Парфенова, Н.А. Новикова // Материалы научно-практической конференции научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире», п. Оболенск, Московская обл., 21-22 апреля 2009 г. – Оболенск. - 2009. - С 74-76.
 3. **Фомина С.Г.** Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов человека, обнаруженных у детей с гастроэнтеритом в Нижнем Новгороде / **С.Г. Фомина**, Л.Н.Голицына, Н.А. Новикова, Н.В. Епифанова, Л.Б. Луковникова, О.В. Парфенова // Медицинский Альманах. – 2009. - №2. – С. 121-123.
 4. **Фомина С. Г.** Анализ циркуляции энтеровирусов среди детей с гастроэнтеритом / **С. Г. Фомина**, Л. Н. Голицына, Л. Б. Луковникова, Н. В. Епифанова, О. В. Парфенова, Н. А. Новикова // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным заболеваниям, Москва, 29-31 марта 2010 г. - М. - 2010. - С. 342.
 5. **Фомина С.Г.** Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей участка гена VP1 и фрагмента 5'-НТР генома вирусов ЕСНО 30, выделенных от больных серозным менингитом и гастроэнтеритом / **С.Г. Фомина**, Л.Н. Голицына, О.В. Парфенова, Н.А. Новикова // Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов «Современные технологии обеспечения биологической безопасности», п. Оболенск, Московская обл., 25-27 мая 2010 г. – Оболенск. - 2010. - С. 308-310.
 6. **Фомина С.Г.** Мониторинг циркуляции энтеровирусов среди детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде в 2006-2010гг. / **С.Г. Фомина**, Н.А. Новикова // Медицинский альманах. - 2011. - № 4. - С. 28-29.
 7. **Фомина С.Г.** Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов вида С / **С.Г. Фомина** // Материалы Всероссийской научно-

практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения», Пермь, 16-18 мая 2012 г. – Пермь. - 2012. - Т. II. - С. 269-273.

8. Голицына Л.Н. Неполиомиелитные энтеровирусы, идентифицированные у больных с различной формой энтеровирусной инфекции / Л.Н. Голицына, **С.Г. Фомина**, О.В. Парфенова, Н.В. Епифанова, В.В. Зверев, Л.Б. Луковникова, О.В. Морозова, Т.А. Сашина, Л.Л. Климова, А.В. Семенова, Н.А. Калашникова, Н.А. Новикова // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», Москва, 12-13 апреля 2012 г. - М. - 2012. - Т. 2. - С. 527.
9. **Фомина С.Г.** Энтеровирусы у детей с острой кишечной инфекцией / **С.Г. Фомина**, Л.Б. Луковникова, Н.В. Епифанова, Л.Н. Голицына, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», Москва, 12-13 апреля 2012 г. - М. - 2012. - Т. 2. - С. 334.
10. **Фомина С.Г.** Энтеровирусы у детей с острой кишечной инфекцией: молекулярно-эпидемиологические аспекты / **С.Г. Фомина**, Н.А. Новикова // Инфекционные болезни. - 2012. - Т. 10, № 4. - С. 12-18.
11. Патент 2441917 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12N 15/41. Способ идентификации 5'-НТР генома энтеровирусов геногруппы ЭВІ и геногруппы ЭВІІ с использованием полимеразной цепной реакции / Новикова Н.А., Голицына Л.Н., **Фомина С.Г.**; заявитель и патентообладатель ФГУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора (RU). - № 2010114528/10; заявл. 12.04.10; опубл. 10.02.12, Бюл. № 4.