

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-036.22:578.835.1(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

Поступила в редакцию 18.01.2024

Received 18.01.2024

**Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, З. Ф. Богущ, Ю. А. Шилова,
Ю. Б. Колтунова, И. В. Бельская**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВИРУСОВ ЕСНО30, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БЕЛАРУСИ НА ПРОТЯЖЕНИИ ПОСЛЕДНИХ 25 ЛЕТ

Аннотация. В работе приведены результаты наиболее полного молекулярно-эпидемиологического исследования одного из самых эпидемически значимых как в глобальном масштабе, так и на территории Беларуси энтеровирусов (ЭВ) – вируса ЕСНО30, включая описание его эволюционной траектории и путей географического распространения.

Цель работы – молекулярно-эпидемиологический анализ вируса ЕСНО30, циркулировавшего в Республике Беларусь с 1997 по 2021 г.

Установлено, что за весь период наблюдения ЕСНО30 был вторым по распространенности типом ЭВ, уступая только вирусу Коксаки В5. Периоды наиболее активной его циркуляции совпадали с годами эпидемических подъемов заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ). Среди клинических форм инфекции, вызванной ЕСНО30, преобладали кишечные и неврологические. Идентифицировано 10 циркулировавших в Беларуси различных его геновариантов, которые входили в три генотипа вируса, имевших глобальное распространение, – ЕСНО30_E, ЕСНО30_F и ЕСНО30_H. Во время трех эпидемических подъемов вызванной ЕСНО30 заболеваемости имела место параллельная циркуляция двух различных геновариантов, принадлежавших к одному (2013–2014 гг.) или различным (1997, 2017–2018 гг.) генотипам. Одновременно циркулирующие геноварианты имели различную эволюционную траекторию и/или филогеографию.

Полученные результаты имеют важное значение для понимания эпидемиологических процессов, лежащих в основе формирования заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь.

Ключевые слова: энтеровирус, энтеровирусная инфекция, ЕСНО30, молекулярная эпидемиология, генотип

Для цитирования: Молекулярная эпидемиология вирусов ЕСНО30, циркулирующих в Беларуси на протяжении последних 25 лет / Н. В. Поклонская [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 224–236. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

**Natalia V. Paklonskaya, Tamara V. Amvrosieva, Zoya F. Bogush, Yulia A. Shilava,
Yulia B. Kaltunova, Ina V. Belskaya**

Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ECHOVIRUS 30 IN BELARUS OVER THE LAST 25 YEARS

Abstract. The article presents the results of the most complete molecular epidemiology study of one of the most epidemically significant enteroviruses (EV), both globally and in Belarus – Echovirus 30, including a description of its evolutionary trajectory and routes of geographic distribution.

The purpose of the presented work was to study a molecular epidemiology of Echovirus 30 in the Republic of Belarus from 1997 to 2021.

During the observation period, Echovirus 30 was the second most common type of EV after Coxsackievirus B5. The highest Echovirus 30 activity was registered at the time of enteroviral morbidity epidemic upsurge. Intestinal and neurological forms predominated in the spectrum of Echovirus 30 clinical presentation. We identified 10 different genetic variants of Echovirus 30 that circulated in Belarus, which were included in three global Echovirus 30 genotypes – ECHO30_E, ECHO30_F and ECHO30_H. At the time of morbidity epidemic rises in 1997, 2013–2014, and 2017–2018 there was a parallel circulation of two different genetic variants of the virus belonging to the same (2013–2014) or different (1997, 2017–2018) genotypes. Simultaneously circulating genetic variants of Echovirus 30 had different evolutionary trajectory and/or routes of geographic distribution.

The obtained results are important for understanding the epidemiological processes underlying the enteroviral morbidity in the Republic of Belarus.

Keywords: enterovirus, enterovirus infection, Echovirus 30, molecular epidemiology, genotype

For citation: Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Bogush Z. F., Shilova Y. A., Kaltunova Y. B., Belskaya I. V. Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Belarus over the last 25 years. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 224–236 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

Введение. Энтеровирусы (ЭВ) входят в сем. Picornaviridae, которое объединяет 68 родов и 158 видов вирусов. ЭВ человека принадлежат к четырем видам Enterovirus A–D, которые включают более 100 различных типов патогенных агентов и вместе с тремя видами риновирусов входят в род *Enterovirus* [1]. Все ЭВ – мелкие, безоболочечные вирусы, геном которых представлен одноцепочечной +РНК размером около 7 500 нт [2]. Уровень генетической изменчивости ЭВ чрезвычайно высок [3] и поддерживается как за счет точечных мутаций (генетический дрейф) [4], так и за счет рекомбинации (генетический шифт) [5], вследствие чего в пределах отдельных типов ЭВ выделяются различные геногруппы, генотипы и геноварианты [6], которые циркулируют среди людей одновременно и/или сменяя друг друга с течением времени. Значительное генетическое многообразие является одной из причин, по которой различные типы ЭВ могут иметь разные паттерны циркуляции – от регулярно регистрируемых вспышек различного масштаба, до широкого бессимптомного носительства. В основе эпидемиологии энтеровирусной инфекции (ЭВИ) лежит множество факторов, которые могут быть связаны как с биологическими и социальными особенностями населения, так и с биологическими характеристиками возбудителя, которые предопределяются его генетической структурой, а также с различными климатическими, природными и другими внешнесредовыми факторами. Поэтому молекулярная эпидемиология ЭВ, в основе которой лежат появление, распространение, изменения и смена различных генотипов ЭВ, является предметом пристального внимания ученых во всем мире.

Некоторые типы ЭВ вызывают наибольший интерес вследствие их широкого распространения, значительного вклада в формирование групповой заболеваемости, а также тяжести клинических проявлений, которыми сопровождается вызываемая ими болезнь. К числу таких ЭВ можно отнести в первую очередь Enterovirus A71 [7], вирус ЕСНО30 [8–10] и Enterovirus D68 [11], а также ряд других. И если Enterovirus A71 и Enterovirus D68 до настоящего времени крайне редко обнаруживались в нашей стране, то из всего спектра циркулирующих в Беларуси вирусов ЕСНО30 относится, безусловно, к наиболее эпидемически значимым ЭВ. Данный возбудитель был этиологическим агентом двух наиболее крупных вспышек ЭВИ – в 1997 г. в Гомеле [12] и в 2003 г. в Минске [13] (пострадало более 600 и 1500 человек соответственно, а преобладающей клинической формой был серозный менингит). Помимо этого, вирус ЕСНО30 занимает одно из ведущих мест в рейтинге доминирующих типов ЭВ и довольно часто обнаруживается у пациентов с различными клиническими формами ЭВИ, в первую очередь – с серозным менингитом [14].

Цель исследования – молекулярно-эпидемиологический анализ вируса ЕСНО30, циркулировавшего в Республике Беларусь с 1997 по 2021 г.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследований послужили нуклеотидные последовательности полного гена *VPI* или его фрагмента, 85 изолятов ЕСНО30, обнаруженных у пациентов с ЭВИ или в пробах сточной воды в период с 1997 по 2021 г.

Для выделения вирусов в культурах клеток RD, BGM использовали стандартную методику. Выделенные цитопатические агенты идентифицировали с помощью реакции нейтрализации микрометодом («Инструкция по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций», рег. № 133-1204 от 12.04.2005) с использованием панели коммерческих иммунных группо- и типоспецифических в отношении ЭВ сывороток производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов (г. Москва). В тех случаях, когда из пробы не удалось выделить полноценный вирус, проводили генетический анализ вирусной РНК, обнаруженной в образце биологического материала.

Детекцию ЭВ методом ОТ-ПЦР проводили с использованием методик, разработанных в лаборатории [15, 16], а также коммерческих тест-систем АмплиСенс® Enterovirus-FL (Россия), «Тест-системы для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР». РНК из проб выделяли с помощью набора «НК-экстра» (все – производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). Нуклеотидную последовательность полного гена *VPI* или его фрагмента определяли, используя несколько комплектов праймеров («Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции: инструкция по применению», рег. № 165-1208 от 11.06.2009). Секвенирование ДНК проводили методом терминации цепи с последующим анализом на ДНК-анализаторе

SEQ8000. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, выбор оптимальной модели эволюции, филогенетическую реконструкцию методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood (ML)) [17] и определение достоверности ее топологии) выполняли с помощью программного продукта MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 7.0 [18]. Референсные последовательности были получены из базы данных Genbank, а также с использованием интернет-ресурса BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Филогенетическое дерево с временной шкалой и анализом географического распространения изолятов было реконструировано методом Монте-Карло для марковских цепей (MCMC) с использованием некоррелированной модели логнормальных расслабленных часов [19], входящих в компьютерный пакет программ BEAST, версия 1.10.4 [20]. Калибровку осуществляли на основании дат идентификации изолятов и штаммов, включенных в реконструкцию, в качестве модели эволюции использовали общую обратимую во времени модель (general time reversible (GTR)) с учетом гамма-распределения нуклеотидных замен и инвариантных сайтов. Длина цепей MCMC составила 100 млн, образцы отбирались каждые 100 тыс. шагов. Файл трассировки, созданный с помощью байесовской филогенетической реконструкции, был визуализирован и проанализирован в Tracer, версия 1.7 [21]. Сходимость параметров рассматривали при наличии значений эффективного размера выборки (ESS), превышающих 200. С максимальной достоверностью клады дерева (Maximum Clade Credibility, MCC) были суммированы с помощью TreeAnnotator 1.8.4 (часть пакета BEAST 1.10.4), при этом прожиг соответствовал 10 %, а затем визуализированы и отредактированы в FigTree, версия 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Достоверность обнаруживаемых различий оценивали на основании критерия χ^2 , доверительные интервалы долей рассчитывали по распределению Пуассона (через χ^2) [22].

Результаты исследования. В рамках осуществляемого на территории Республики Беларусь эпидемиологического слежения за ЭВИ и лабораторного мониторинга ЭВ в течение 1996–2021 гг. установлен тип 1 385 изолятов ЭВ, циркулировавших в нашей стране. По результатам анализа типового разнообразия ЭВ изоляты ЕСНО30 составили 12,0 [10,3; 14,0] % от всех идентифицированных и заняли второе место в рейтинге доминирующих типов ЭВ, уступая только Коксаки В5.

Результаты эпидемиологического слежения за заболеваемостью ЭВИ свидетельствовали о том, что в Беларуси, как и в других странах мира, имеет место чередование подъемов и спадов заболеваемости с интервалом 2–3 года (рис. 1). Так, в 2003, 2006, 2009, 2013–2014, 2016–2019 гг. имел место рост заболеваемости ЭВИ, тогда как в 2004–2005, 2007–2008, 2011–2012, 2015 и 2020–2021 гг. отмечалось ее снижение. К сожалению, официальная регистрация ЭВИ до 2003 г.

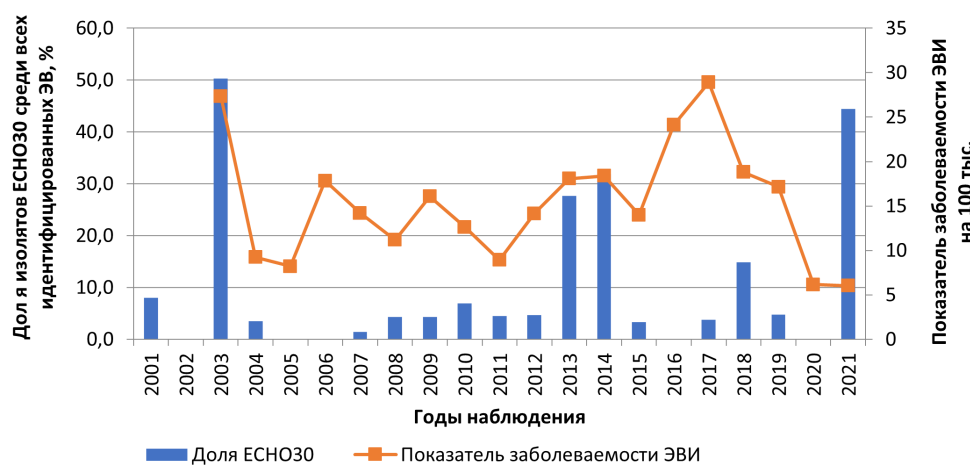


Рис. 1. Доля изолятов ЕСНО30 в общем спектре идентифицированных ЭВ по годам на фоне подъемов и спадов заболеваемости ЭВИ

Fig. 1. Proportion of Echovirus 30 isolates in the total spectrum of identified EVs by year against the backdrop of variations in the enterovirus morbidity

в нашей стране не осуществлялась, поэтому показатель заболеваемости ЭВИ на 100 тыс. населения в 1997–2002 гг. неизвестен. В годы эпидемических подъемов был идентифицирован 521 изолят ЭВ, 133 из них принадлежали к типу ЕСНО30 (25,5 [21,4; 30,3] %), тогда как в сезоны эпидемического благополучия был определен тип 447 возбудителей ЭВИ, в том числе – только 10 изолятов ЕСНО30 (2,2 [1,1; 4,1] %). Сравнение частоты выявления ЕСНО30 в годы эпидемических подъемов и спадов заболеваемости показало, что в периоды ее роста вирус ЕСНО30 обнаруживался достоверно чаще ($\chi^2 = 103,656$; $p < 0,001$).

Для установления спектра клинических проявлений инфекции, вызванной ЕСНО30, были проанализированы данные 425 пациентов с ЭВИ, лабораторно подтвержденной методом ОТ-ПЦР, за период с 2016 по 2020 г. Среди этих пациентов у 23 человек был идентифицирован вирус ЕСНО30. На рис. 2 представлена частота различных клинических проявлений у всех пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ и у тех, у кого был идентифицирован вирус ЕСНО30. Так, у пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ, вызванной различными типами ЭВ, основные клинические формы (нейроинфекции, острый гастроэнтерит, ОРВИ и неутонченная ЭВИ) были представлены с сопоставимой частотой – 19,1–28,9 %, реже встречались только экзантемы и кардиты. Спектр клинических проявлений ЭВИ, этиологически связанной с вирусом ЕСНО30, имел заметные отличия. Так, заболевание чаще всего сопровождалось неврологическими проявлениями (серозный менингит, менингоэнцефалит, менингеальный синдром) у 39,1 [7,9; 74,3] % пациентов, острым гастроэнтеритом – у 52,2 [27,0; 91,1] %, достаточно редко – симптомами ОРВИ и неутонченной ЭВИ (у 4,4 [0,1; 24,2] % пациентов). При этом кардиты и экзантемы не зарегистрированы.

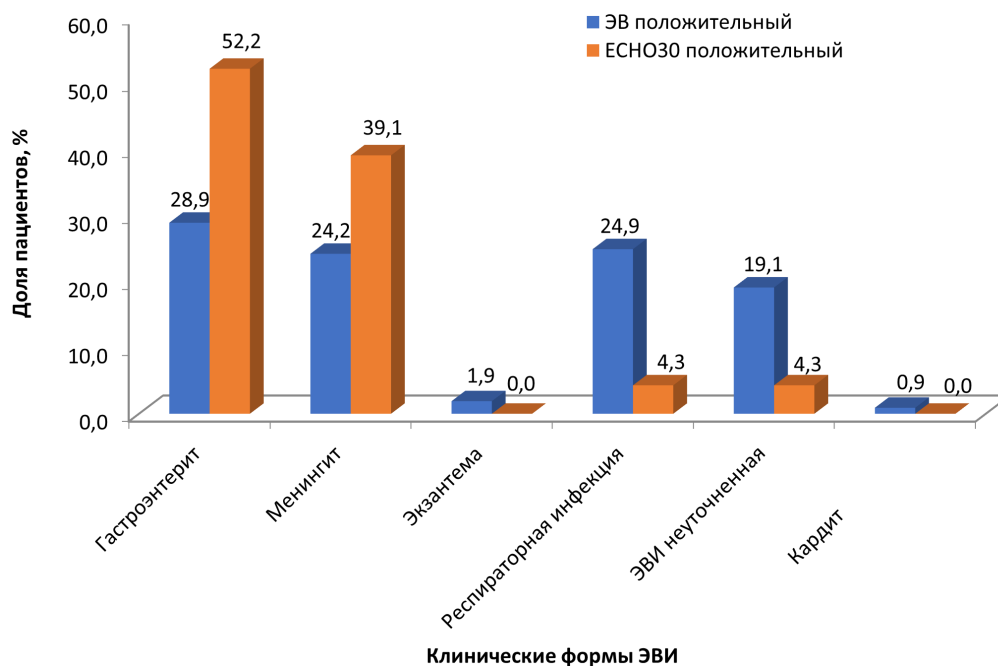


Рис. 2. Частота разных клинических проявлений у пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ и у тех из них, у кого обнаружен вирус ЕСНО30

Fig. 2. Frequency of different clinical manifestations in patients with laboratory-confirmed enterovirus infection and in those with detected Echovirus 30

Сравнение нуклеотидных последовательностей 85 вирусов ЕСНО30, выделенных за весь период наблюдения в нашей стране, показало, что их различия по гену основного капсидного белка VP1 составляли от 0 до 17,0 %. От прототипного штамма Bastianni они отличались на 15,5–19,1 %. При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей между собой установлено, что по степени сходства и периоду циркуляции их можно разделить на 10 групп. Среднее генетическое расстояние (p -расстояние) внутри группы не превышало 2,1 %, между группами – $11,2 \pm 2,0$ % (см. таблицу).

Генетические характеристики групп изолятов ЕСНО30

Genetic characteristics of groups of ECHO30 isolates

Группа ЕСНО30	Годы циркуляции	Кол-во изолятов		Среднее генетическое расстояние, %	
		Всего	Полная нуклеотидная последовательность гена <i>VPI</i>	в группе	между группами
E30_BY1	1997	2	2	0,4	11,2 ± 2,0
E30_BY2	1997	3	2	0,8	
E30_BY3	2002	2	2	0,3	
E30_BY4	2003–2004	16	9	1,6	
E30_BY5	2006–2007	2	2	0,4	
E30_BY6	2009	1	1	–	
E30_BY7	2012–2014	35	6	2,1	
E30_BY8	2012	1	1	–	
E30_BY9	2017–2018	8	4	0,6	
E30_BY10	2018–2021	16	7	0,9	

Для молекулярно-эпидемиологического анализа было выбрано 35 изолятов, представлявших все 10 групп, для которых была установлена полная нуклеотидная последовательность гена *VPI*, так как именно этот регион генома ЭВ используется для генотипирования. Дополнительно в филогенетическую реконструкцию были включены референсные последовательности 89 изолятов и штаммов ЕСНО30, циркулировавших в других странах, которые ранее были генотипированы разными авторами, в том числе прототипные штаммы ЕСНО30 Bastianni (AF311938) и ЕСНО30 Giles (AF081342). В качестве внешней группы была использована нуклеотидная последовательность прототипного штамма ЕСНО21 Farina (AU302547). Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия [19], представлено на рис. 3. Как оказалось, все группы вирусов ЕСНО30, циркулировавших в Беларуси, объединялись в 10 монофилетических кластеров в составе трех генотипов – ЕСНО30_Е, ЕСНО30_F и ЕСНО30_Н по ранее принятой классификации [23]. К генотипу ЕСНО30_Н относились геноварианты вируса E30_BY1 (1997 г.), E30_BY7 (2013–2014 гг.), E30_BY8 (2013 г.), E30_BY9 (2017–2018 гг.). В состав генотипа ЕСНО30_F входили белорусские геноварианты E30_BY2 (1997–1998 гг.), E30_BY3 (2002 г.), E30_BY5 (2006–2007 гг.). В общий кластер генотипа ЕСНО30_Е группировались геноварианты E30_BY4 (2003–2004 гг.), E30_BY6 (2009 г.), E30_BY10 (2018–2021 гг.).

Для изучения географической и временной динамики циркуляции ЕСНО30 в Беларуси была проведена филогенетическая реконструкция на основе алгоритма Байеса с использованием метода МСМС и некоррелированной модели логнормальных расслабленных часов (рис. 4).

Результаты филогенетического анализа показали, что геновариант E30_BY1, идентифицированный в 1997 г. в Беларуси, был первым в мировом масштабе выявленным геновариантом генотипа ЕСНО30_Н (рис. 5). Ближайший общий предок геноварианта E30_BY1 и ветви, давшей начало геноварианту, циркулировавшему в 1999–2000 гг. на территории Украины, датируется на территории Беларуси 1994-м годом (вероятность 70 %). В 1995 г. также на территории Беларуси произошло разделение генетических ветвей, одна из которых дала начало геноварианту вируса, обнаруженного в 1998 г. в Азербайджане (вероятность 72 %). В дальнейшем генотип ЕСНО30_Н циркулировал на территории Китая, откуда, по-видимому, был занесен в Россию в 2007 г. (вероятность 99 %). Белорусский геновариант E30_BY8 (2013 г.) имеет ближайшего общего предка, датированного 2010-м годом, с вирусами ЕСНО30, циркулировавшими в России в 2011 г. (вероятность 65 %), что, вероятно, было следствием его заноса оттуда. Геновариант E30_BY7, циркулировавший в тот же период, имеет ближайшего общего предка с геновариантом E30_BY9, локализованного на территории Беларуси и датированного 2010-м годом (вероятность 98 %), который с вероятностью 100 % был занесен с территории Китая.

В состав генотипа ЕСНО30_F (рис. 6) вошли три белорусских геноварианта – E30_BY2, E30_BY3, E30_BY5. Геновариант E30_BY2 циркулировал в 1997 г. вместе с геновариантом E30_BY1

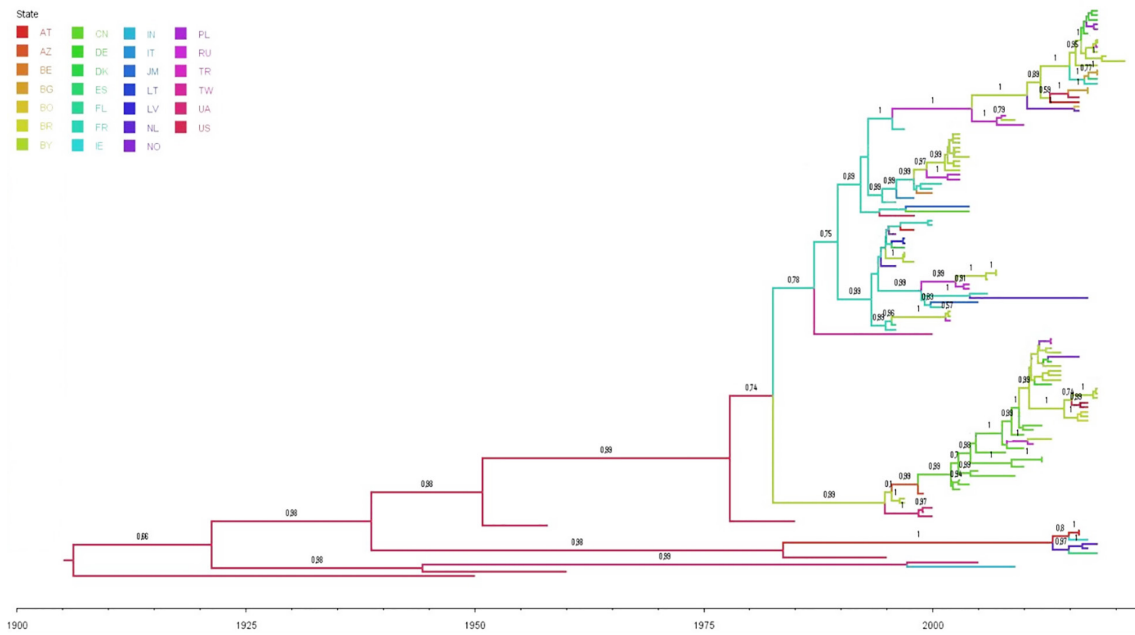


Рис. 4. Дерево с максимальной достоверностью клад, построенное с помощью байесовского анализа 125 нуклеотидных последовательностей ECHO30, длина ветвей соответствует шкале времени (внизу), апостериорная вероятность группирования представлена на ветвях дерева. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения, цветовое обозначение стран – на легенде в левом верхнем углу

Fig. 4. Maximum clade credibility tree for Bayesian coalescent analysis from 125 E30 sequences. Branches are in time scale (years). Posterior probabilities are shown at branches. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is at top right)

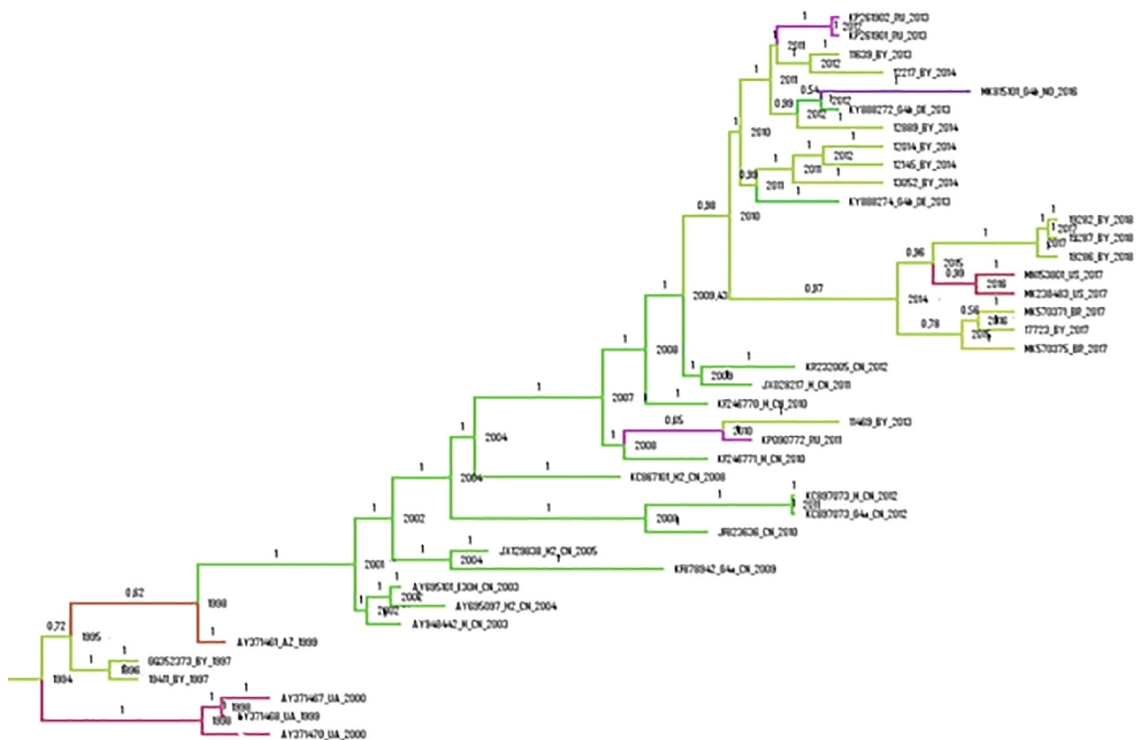


Рис. 5. Дерево с максимальной достоверностью клад генотипа ECHO30_H. В узлах дерева – годы расхождения ветвей от общего предка. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения (легенда на рис. 4), цифры на ветвях – значения вероятности происхождения

Fig. 5. Maximum clade credibility tree of ECHO30_H genotype. Years of divergence from common ancestors are at the nodes of the tree. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is in Fig. 4), the numbers on the branches indicate the probability of origin

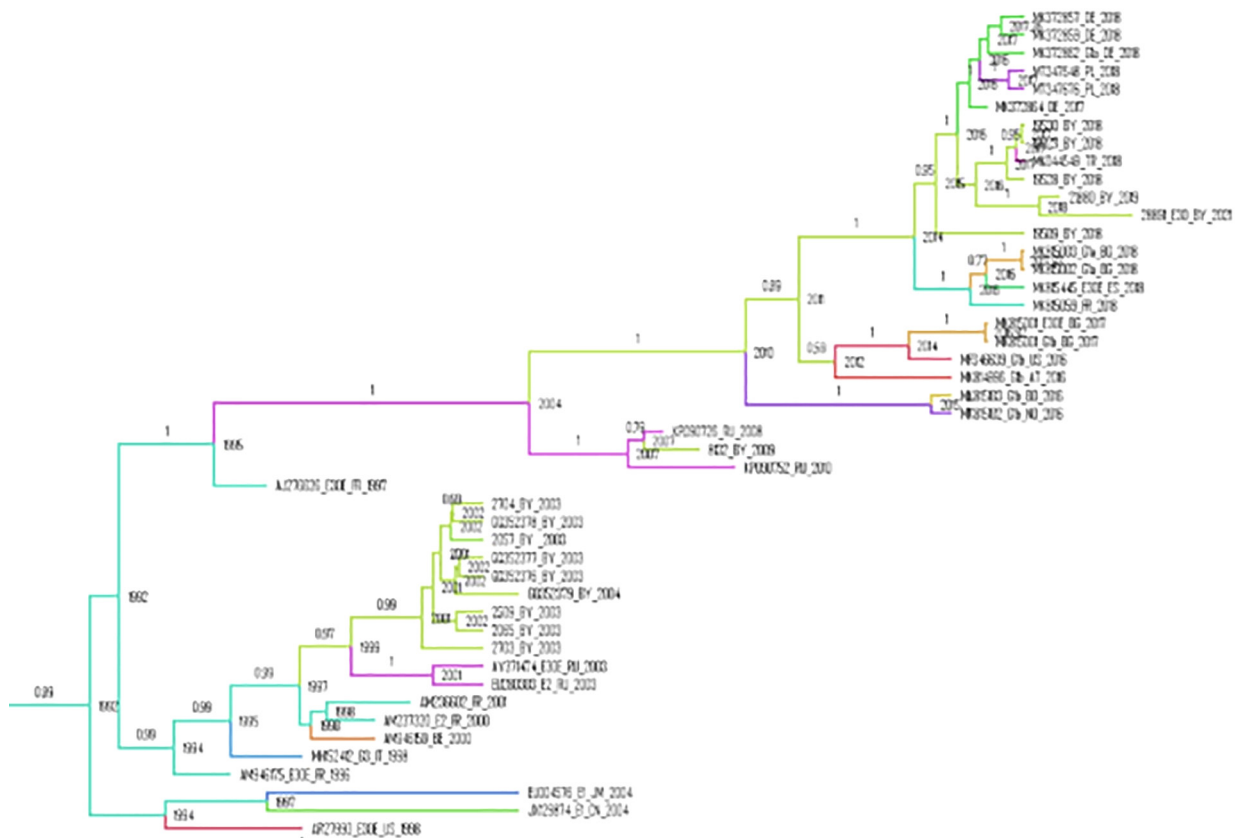


Рис. 7. Древо с максимальной достоверностью клад генотипа ECHO30_E. В узлах древа – годы расхождения ветвей от общего предка. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения (легенда на рис. 4), цифры на ветвях – значения вероятности происхождения

Fig. 7. Maximum clade credibility tree of ECHO30_E genotype. Years of divergence from common ancestors are at the nodes of the tree. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is in Fig. 4), the numbers on the branches indicate the probability of origin

Обсуждение. Вирус ECHO30 относится к наиболее эпидемически значимым в мировом масштабе типам ЭВ. Согласно установленной доли его изолятов из всех идентифицированных за период наблюдения в Беларуси, он является также одним из самых распространенных типов ЭВ в нашей стране. Сравнение частоты выявления данного типа в годы подъемов и спадов заболеваемости ЭВИ указывало на то, что наиболее активная его циркуляция сопровождалась формированием эпидемических подъемов – доля изолятов, идентифицированных в эти периоды была достоверно выше, чем во время спадов. В спектре клинических проявлений инфекции, вызванной ECHO30, преобладали неврологические и кишечные формы. Все это указывает на высокую эпидемическую значимость данного типа ЭВ на территории Беларуси и определяет важность проведения исследований его молекулярной эпидемиологии.

Молекулярная эпидемиология и филодинамика ECHO30 активно изучалась разными авторами как в масштабе отдельных стран, так и на глобальном уровне [9, 10, 23–25]. Впервые результаты подобных исследований, проведенные в 2001–2002 гг., позволили выявить две глобальные геногруппы в пределах типа, одна из которых объединяла изоляты, выделенные в 1950–1980-х годах и к настоящему времени исчезла из циркуляции, а вторая включала генотипы (субтипы, линии, кластеры), часть из которых продолжает циркулировать и в настоящее время [25]. Тогда же было высказано предположение об основном паттерне молекулярной эпидемиологии ECHO30, согласно которому имеет место глобальное распространение и преобладание одной генетической линии (геногруппы), которая сменяется следующей с течением времени. В 2009 г. была представлена работа, в которой были выделены отдельные генотипы ECHO30_A – ECHO30_H в пределах геногруппы II [23]. В последующем, вплоть до недавнего времени, в исследованиях молекулярной

эпидемиологии ЕСНО30 разными авторами была использована именно эта классификация. Она же была взята за основу при проведении настоящих исследований. Далее эти исследования получили развитие, и было показано, что из 8 генотипов ЕСНО30 продолжается параллельное глобальное распространение четырех (ЕСНО30_А, ЕСНО30_Е, ЕСНО30_F, ЕСНО30_Н), а еще четыре исчезли из циркуляции [24]. Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что за последние 25 лет на территории Беларуси имела место циркуляция трех из четырех глобально циркулирующих генотипов ЕСНО30. В 2021 г. вышла работа, посвященная молекулярной эпидемиологии ЕСНО30, вызвавших значительный эпидемический подъем заболеваемости в 2016–2018 гг. на территории стран Евросоюза. По ее итогам была идентифицирована новая геногруппа вируса ЕСНО30 – геногруппа III [10]. Эволюционное расстояние между входившими в нее изолятами и вирусами различных ранее известных генотипов геногруппы II (ЕСНО30_А, Е, F, Н) было достаточно велико, и на филогенетической реконструкции геногруппа III была представлена отдельным кластером, не входящим в геногруппу II. В Республике Беларусь циркуляция геногруппы III до настоящего времени не регистрировалась.

Первые работы, посвященные молекулярной эпидемиологии ЕСНО30, сформировали теорию, согласно которой периоды эпидемических подъемов заболеваемости, вызванной ЕСНО30, сопровождаются активной циркуляцией одного генетического геноварианта. Это представление противоречит полученным нами данным о генетической характеристике этиологических агентов вспышки 1997 г. в Гомеле [26], которые, очевидно, принадлежали к разным геновариантам вируса и характеризовались значительным эволюционным расстоянием. Такие же результаты были получены другими авторами при изучении молекулярной эпидемиологии вызвавших вспышку во Франции в 2000 г. ЕСНО30, которые принадлежали к разным субтипам вируса. Представленные в настоящей работе результаты (см. рис. 3) свидетельствуют о том, что этиологические агенты вспышки в Гомеле принадлежали к двум геновариантам, которые относились к различным генотипам – ЕСНО30_Н и ЕСНО30_F и имели совершенно разную эволюционную историю и филогеографию. Так, если геновариант E30_BY2 сформировался на территории Западной Европы, а близкородственные ему изоляты в тот же период времени выявлялись на территории множества европейских государств, то геновариант E30_BY1, по-видимому, впервые появился в нашей стране незадолго до вспышки 1997 г. Аналогичная ситуация, когда во время эпидемического подъема заболеваемости регистрировалась параллельная циркуляция двух различных геновариантов ЕСНО30, имела место в 2013 и 2017–2018 гг. Так, циркулировавшие одновременно в 2013 г. геноварианты E30_BY7 и E30_BY8 были объединены общей эволюционной историей и принадлежали к одному генотипу ЕСНО30-Н, однако отличались филогеографией: геновариант E30_BY7 был занесен в Беларусь непосредственно из Китая, тогда как геновариант E30_BY8, согласно данным филогенетической реконструкции, имел российское происхождение. Геноварианты E30_BY9 и E30_BY10, циркулировавшие в 2017–2018 гг., принадлежали к разным генотипам – ЕСНО30_Н и ЕСНО30_Е соответственно, имели разную эволюционную историю и филогеографию. В глобальных исследованиях, проведенных на территории Евросоюза, также было показано, что в 2016–2018 гг. регистрировалась параллельная циркуляция нескольких различных геновариантов вируса ЕСНО30 на одной и той же территории [10]. Это, по мнению авторов, опровергает предположение о том, что эпидемический подъем заболеваемости обусловлен селекцией наиболее трансмиссивного и/или вирулентного варианта вируса, и может быть объяснено накоплением неиммунного контингента среди детей, которые еще не сталкивались с возбудителем, и молодых взрослых, иммунный ответ у которых исчез со временем. Еще одним объяснением может быть накопление мутаций вирусами вследствие стратегии ускользания от распознавания иммунной системой. Результаты включения в представленный в настоящей работе анализ референсных последовательностей ЕСНО30 из Западной Европы, которые были получены авторами при расследовании эпидемического подъема 2018 г., показали, что белорусские геноварианты также входили в некоторые генетические клады, циркулировавшие в различных европейских странах в 2016–2018 гг. и вызвавшие эпидемический подъем заболеваемости. Так, согласно результатам филогенетической реконструкции, белорусский геновариант E30_BY7 соответствовал европейской кладе G4b, геновариант E30_BY9 – кладе G4a, а геновариант E30_BY10 – кладе G1a, вызвавшей в 2018 г. эпидемический подъем заболеваемости во многих странах Евросоюза.

Заключение. В настоящей работе представлено наиболее полное молекулярно-эпидемиологическое исследование одного из самых эпидемически значимых ЭВ – вируса ЕСНО30 на территории Беларуси за последние 25 лет, включающее описание его эволюционной траектории и путей географического распространения.

Показано, что за весь период наблюдения вирус ЕСНО30 был вторым по распространенности типом ЭВ, уступая только вирусу Коксаки В5. При этом периоды наиболее активной его циркуляции совпадали с годами эпидемических подъемов заболеваемости ЭВИ. Среди клинических форм инфекции, вызванной ЕСНО30, преобладали кишечные и неврологические. За последние 25 лет на территории Беларуси регистрировалась циркуляция 10 различных геновариантов ЕСНО30, которые принадлежали к трем генотипам вируса, имеющим глобальное распространение, – ЕСНО30_E, ЕСНО30_F и ЕСНО30_H.

Три из четырех эпидемических подъемов заболеваемости, вызванных вирусом ЕСНО30 (1997, 2013–2014 и 2017–2018 гг.), были обусловлены параллельной циркуляцией двух геновариантов, принадлежащих к одному (2013–2014 гг.) или различным (1997, 2017–2018 гг.) генотипам вируса. Одновременно циркулирующие геноварианты имели различную эволюционную траекторию и/или филогеографию. Установлено, что все геноварианты ЕСНО30, которые регистрировались за период наблюдения, попадали на территорию Беларуси из трех регионов: Западной Европы, России, Китая. Обнаружено и обратное распространение геновариантов из Беларуси на территорию других стран.

Полученные нами результаты имеют важное значение для понимания эпидемиологических процессов, лежащих в основе формирования заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь. Помимо этого, представленные данные позволяют заполнить пробелы в глобальных исследованиях молекулярной эпидемиологии ЕСНО30. Вместе с тем полученная информация, безусловно, является неполной, так как освещает только один аспект молекулярной эволюции данного возбудителя, связанный с генетическим дрейфом, и не принимает во внимание его генетическую вариативность, возникающую вследствие рекомбинации, что диктует необходимость дальнейшего продолжения и расширения исследований, посвященных молекулярной эпидемиологии ЭВ.

Список использованных источников

1. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses / P. Simmonds [et al.] // *Arch. Virol.* – 2020. – Vol. 165, N 3. – P. 793–797. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
2. Pallansch, M. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses / M. Pallansch, R. Roos // *Fields Virol.* – 5th ed. – Philadelphia, 2007. – P. 839–893.
3. Lukashev, A. N. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses / A. N. Lukashev, Y. A. Vakulenko // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98, N 12. – P. 2968–2981. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966>
4. Sanjuán, R. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses / R. Sanjuán // *PLoS Pathogens.* – 2012. – Vol. 8, N 5. – P. e1002685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
5. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process / C. Muslin [et al.] // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, N 9. – P. 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
6. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? / A. N. Lukashev [et al.] // *Rev. Med. Virol.* – 2018. – Vol. 28, N 6. – Art. e2002. <https://doi.org/10.1002/rmv.2002>
7. Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review / G. Nayak [et al.] // *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* – 2022. – Vol. 11, N 1. – Art. 78. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00258-4>
8. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium / E. Wollants [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2019. – Vol. 121. – Art. 104205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
9. Epidemiology of Echovirus 30 infections detected in a University Hospital in Catalonia, Spain, in 1995–2020 / M. Del Cuerdo [et al.] // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10, N 3. – Art. 592. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030592>
10. Molecular epidemiology and evolutionary trajectory of emerging Echovirus 30, Europe / K. S. M. Benschop [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 27, N 6. – P. 1616–1626. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203096>
11. Holm-Hansen, C. C. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review / C. C. Holm-Hansen, S. E. Midgley, T. K. Fischer // *Lancet. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 16, N 5. – P. e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
12. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus / T. V. Amvrosieva [et al.] // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2001. – Vol. 9, N 3. – P. 154–157.
13. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents / T. V. Amvrosieva [et al.] // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2006. – Vol. 14, N 2. – P. 67–73. <https://doi.org/10.21101/cejph.a3369>
14. Молекулярная эпидемиология энтеровирусов, вызывающих тяжелые неврологические формы инфекции / Н. В. Поклонская [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2017. – № 3. – С. 29–36.

15. Использование различных модификаций метода ПЦР при диагностике энтеровирусных инфекций / Н. В. Поклонская [и др.] // Мед. новости. – 2004. – № 1. – С. 91–93.
16. Модифицированный метод гнездовой полимеразной цепной реакции в одной пробирке для детекции энтеровирусов / Н. В. Поклонская [и др.] // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – № 4. – С. 4.
17. Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein // J. Mol. Evol. – 1981. – Vol. 17, N 6. – P. 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
18. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Mol. Biol. Evol. – 2016. – Vol. 33, N 7. – P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
19. Relaxed phylogenetics and dating with confidence / A. J. Drummond [et al.] // PLoS Biol. – 2006. – Vol. 4, N 5. – P. e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
20. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 / M. A. Suchard [et al.] // Virus Evol. – 2018. – Vol. 4, N 1. – Art. vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
21. Posterior summarization in Bayesian Phylogenetics using Tracer 1.7 / A. Rambaut [et al.] // Syst. Biol. – 2018. – Vol. 67, N 5. – P. 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
23. Bailly, J. L. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene / J. L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell // Infect. Genet. Evol. – 2009. – Vol. 9, N 4. – P. 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.04.009>
24. Global phylogenetics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages / C. Lema [et al.] // Virology. – 2019. – Vol. 531. – P. 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
25. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages / G. Palacios [et al.] // J. Virol. – 2002. – Vol. 76, N 10. – P. 4940–4949. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002>
26. Молекулярная характеристика и филогенетический анализ энтеровирусов, вызвавших вспышки и сезонные подъемы заболеваемости в разных регионах Республики Беларусь / Т. В. Амвросьева [и др.] // Журн. микробиол. – 2006. – № 3. – С. 17–21.

References

1. Simmonds P., Gorbalenya A. E., Harvala H., Hovi T., Knowles N. J., Lindberg A. M. [et al.]. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Archives of Virology*, 2020, vol. 165, no. 3, pp. 793–797. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
2. Pallansch M., Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virology. 5th ed.* Philadelphia, 2007, pp. 839–893.
3. Lukashov A. N., Vakulenko Y. A. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *Journal of General Virology*, 2017, vol. 98, no. 12, pp. 2968–2981. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966>
4. Sanjuán R. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathogens*, 2012, vol. 8, no. 5, p. e1002685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
5. Muslin C., Mac Kain A., Bessaud M., Blondel B., Delpyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 9, p. 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
6. Lukashov A. N., Vakulenko Y. A., Turbabin N. A., Deviatkin A. A., Drexler J. F. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Reviews in Medical Virology*, 2018, vol. 28, no. 6, art. e2002. <https://doi.org/10.1002/rmv.2002>
7. Nayak G., Bhuyan S. K., Bhuyan R., Sahu A., Kar D., Kuanar A. Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2022, vol. 11, no. 1, art. 78. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00258-4>
8. Wollants E., Beller L., Beuselinck K., Bloemen M., Lagrou K., Reynders M., Van Ranst M. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium. *Journal of Clinical Virology*, 2019, vol. 121, art. 104205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
9. Del Cuerpo M., Gonzalez de Audicana J., Fernandez-Garcia M. D., Marín P., Esteban M., Español M., Cabrerizo M., Rabella N. Epidemiology of Echovirus 30 infections detected in a University Hospital in Catalonia, Spain, in 1995–2020. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 3, p. 592. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030592>
10. Benschop K. S. M., Broberg E. K., Hodcroft E., Schmitz D., Albert J., Baicus A. [et al.] Molecular epidemiology and evolutionary trajectory of emerging Echovirus 30, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, vol. 27, no. 6, pp. 1616–1626. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203096>
11. Holm-Hansen C. C., Midgley S. E., Fischer T. K. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet. Infectious diseases*, 2016, vol. 16, no. 5, pp. e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
12. Amvrosieva T. V., Titov L. P., Mulders M., Hovi T., Dyakonova O. V., Votyakov V. I. [et al.]. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus. *Central European Journal of Public Health*, 2001, vol. 9, no. 3, pp. 154–157.
13. Amvrosieva T. V., Paklonskaya N. V., Biazruchka A. A., Kazinetz O. N., Bohush Z. F., Fisenko E. G. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Central European Journal of Public Health*, 2006, vol. 14, no. 2, pp. 67–73. <https://doi.org/10.21101/cejph.a3369>
14. Paklonskaya N. V., Amvros'eva T. V., Lozyuk S. K., Shilova Yu. A., Bogush Z. F., Biskina N. M. Molecular epidemiology of enteroviruses causing severe neurological infection forms. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 29–36 (in Russian).
15. Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Dzyakanava O. V., Shcherbakova O. B. The use of various modifications of the PCR method in the diagnosis of enteroviral infections. *Meditsinskie novosti = Medical news*, 2004, no. 1, pp. 91–93 (in Russian).

16. Poklonskaya N. V., Amvros'eva T. V., D'yakonova O. V., Shcherbakova O. B., Voilokova R. Ya. Modified one-tube nested polymerase chain reaction method for detection of enteroviruses. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian clinical laboratory diagnostics*, 2004, no. 4, pp. 46–47 (in Russian).
17. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, vol. 17, no. 6, pp. 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
18. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
19. Drummond A. J., Ho S. Y., Phillips M. J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 2006, vol. 4, no. 5, p. e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
20. Suchard M. A., Lemey P., Baele G., Ayres D. L., Drummond A. J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 2018, vol. 4, no. 1, art. vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
21. Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A. Posterior summarization in Bayesian Phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 2018, vol. 67, no. 5, pp. 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Glanz S. A. *Primer of Biostatistics. 4th ed.* New York, McGraw-Hill Inc., 1997. 473 p.
23. Bailly J. L., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonné F., Traoré O., Peigue-Lafeuille H. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infection, genetics and evolution*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.04.009>
24. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M. C., Gómez R. M. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*, 2019, vol. 531, pp. 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
25. Palacios G., Casas I., Cisterna D., Trallero G., Tenorio A., Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *Journal of Virology*, 2002, vol. 76, no. 10, pp. 4940–4949. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002>
26. Amvros'eva T. V., Poklonskaya N. V., Bezruchko A. A., Fisenko E. G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of enteroviruses inducing the outbreaks and seasonal rises of morbidity in different regions of the Republic of Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, 2006, no. 3, pp. 17–21 (in Russian).

Информация об авторах

Поклонская Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6431-5050>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Амвросьева Тамара Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-7309-152X>. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Богуш Зоя Федоровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Шилова Юлия Александровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-4521-6599>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Колтунова Юлия Борисовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-6488-9422>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Бельская Инна Валерьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-4044-6827>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Information about the authors

Natalia V. Paklonskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6431-5050>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Tamara V. Amvrosieva – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-7309-152X>. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Zoya F. Bogush – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

Yulia A. Shilava – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-4521-6599>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Yulia B. Kaltunova – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-6488-9422>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Ina V. Belskaya – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-4044-6827>. E-mail: labsanvir@gmail.com