

Н.В.Поклонская¹, Е.П.Кишкурно², Т.В.Амвросьева¹, А.А.Безручко¹

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ВЫЗВАВШИХ ВСПЫШЕЧНУЮ И СПОРАДИЧЕСКУЮ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ В г. МИНСКЕ В 2003-2005 гг.

ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии»¹,
Белорусский государственный медицинский университет²

В работе установлены генетические характеристики основных серотипов энтеровирусов, циркулировавших среди населения г. Минска в 2003 – 2005 гг., на основании результатов их молекулярно-эпидемиологического анализа.

Энтеровирусы (ЭВ) являются одними из самых распространенных вирусных агентов. Они широко циркулируют в человеческой популяции и способны длительное время сохраняться в объектах окружающей среды. Благодаря своей пантропности ЭВ вызывают довольно широкий спектр заболеваний, которые могут протекать в виде сезонных эпидемических подъемов или вспышек. За последние 10 лет на территории Республики Беларусь зарегистрирован ряд вспышек энтеровирусной инфекции (ЭВИ) [2], наиболее массовая из которых имела место в г. Минске в 2003г. (в период с августа по октябрь с различными формами ЭВИ было госпитализировано около 1500 человек) [1]. В следующем 2004г. в г. Минске был зафиксирован сезонный эпидемический подъем ЭВИ, который характеризовался меньшими показателями заболеваемости, другой структурой зарегистрированных клинических форм и сменой доминирующей возрастной группы. Летом-осенью 2005г. заболеваемость ЭВИ в г. Минске регистрировалась на уровне спорадических случаев инфекции. Анализ ее этиологической структуры показал, что доминирующими возбудителями, циркулирующими среди детского населения г. Минска в 2003-2005гг., были вирусы ECHO 30, ECHO 6 и Коксаки В5. При этом в 2003 и 2004 годах у заболевших обнаруживались все 3 вышеуказанных серотипа ЭВ, тогда как в 2005 г. вирус ECHO 30 не регистрировался. Таким образом, в условиях циркуляции практически одних и тех же доминирующих серотипов, эпидемические характеристики заболеваемости ЭВИ в г. Минске в 2003г., 2004г. и 2005г. значительно различались. Это обстоятельство явилось основанием для проведения соответствующих исследований выделенных в разные годы доминирующих возбудителей на молекулярно-генетическом уровне.

Целью настоящих исследований было установление генетических характеристик 3-х основных серотипов энтеровирусов (ECHO 30, ECHO 6 и Коксаки В5), циркулировавших среди населения г. Минска в 2003 – 2005гг., на основании результатов их молекулярно-эпидемиологического анализа.

Материал и методы

В работе использовали 21 изолят вирусов ECHO 6, ECHO 30, Коксаки В5, выделенный от детей с различными формами ЭВИ. Накопление, титрование и постановку реакции нейтрализации вирусов Коксаки В 5 осуществляли на перевиваемых культурах клеток BGM и Нер-2С. вирусов ECHO 6 и ECHO 30-на клетках BGM и RD по стандартным протоколам [3].

Для выделения РНК применяли коммерческие наборы «РНК-СОРБ», производства «АмплиСенс», Россия. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (200 ед.) и вирус-специфического праймера. Амплификацию участка генома, локализованного в пределах гена, кодирующего основной капсидный белок (VP1) ЭВ проводили

с праймерами, ранее описанными Oberste et al [7]. Состав реакционной смеси-60мМ ТрисHCl (pH8,5), 15мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,2 мМ MgCl_2 , 200 мкмоль dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы. Результаты амплификации анализировали с помощью гелелектрофореза.

Секвенирование участков ДНК проводили методом терминации цепи в термоциклической реакции с использованием коммерческого набора производства «Amersham Biosciences», включающем термостабильный фермент «Термосеквенза I ДНК-полимераза». Электрофорез и анализ продуктов реакции проводили на автоматическом ДНК-анализаторе «ALFexpress II» с использованием программного продукта «ALFwin Sequence Analyser 2.11» (производство «Amersham Biosciences»). Полученные нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы выравнивали друг относительно друга для удаления неясных оснований и получения консенсусных последовательностей, которые использовали для дальнейшей работы.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных Entrez с помощью программы BLAST [4]. Использовали следующие параметры: поиск ограничивали областью «вирусы», размер слова – 7 или 10. Значения остальных параметров были установлены по умолчанию. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли с помощью MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версия 3.1 [6]. Генетические расстояния между последовательностями определяли на основании 2-х параметрической модели эволюции, предложенной Kimura в 1980 г [5]. Реконструкцию филогенетических древ проводили на основании полученных эволюционных расстояний с помощью алгоритма neighbor-joining [8], встроенного в MEGA. Достоверность топологий полученных филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (бутстрепинг). Для оценки достоверности топологии по каждому дереву были проанализированы 1000 псевдореплик.

Результаты и обсуждение

Молекулярно-эпидемиологические исследования вирусов ECHO 30. Молекулярно-эпидемиологические исследования проводили на основании сравнительного анализа 7 нуклеотидных последовательностей вирусов ECHO 30, выделенных в 2003-2004 гг. в г. Минске и 20 нуклеотидных последовательностей, принадлежавших вирусам того же серотипа, циркулировавшим в 1996 – 2003 гг. в России, странах Европы и Азии (рис.1).

Сравнение вирусов ECHO 30, выделенных в 2003г. от различных больных, между собой и с вирусом, выделенным в 2004 г., показало, что все вирусы ECHO 30, выделенные в 2003 г., были весьма сходны между собой: среднее эволюционное расстояние в пределах данной группы составило

0,011±0,003 нуклеотидных замены/сайт. Установлено, что вирус ECHO 30, выделенный в 2004 г., практически не отличался от вирусов ECHO 30, циркулировавших в 2003 г. Эволюционное расстояние между ними составляло не более 0,022±0,006 нуклеотидных замен/сайт. Результаты филогенетической реконструкции (Рис. 1) показали, что эти вирусы достоверно входят в единый монофилетический кластер. Полученные данные указывают на принадлежность всех вирусов ECHO 30, циркулировавших в 2003-2004 гг., к единому субтипу вируса. Они свидетельствуют о гомогенности популяции вирусов ECHO 30, вызвавших вспышку ЭВИ в г.Минске в 2003г. и сезонный подъем заболеваемости в 2004 г. В 2004 г. население г. Минска столкнулось практически с тем же генетическим вариантом ECHO 30, что и в 2003 году. Это определило особенности возрастной структуры (дети первых года-двух лет жизни, не контактировавшие с вирусом в 2003 г.) и более низкие показатели заболеваемости (80 на 100 тыс. в 2003 г. и 29 на 100 тыс. в 2004 г.).

Сравнение вирусов ECHO 30, выделенных в Минске с вирусами, циркулировавшими в других странах мира, позволило установить, что наиболее близкими к «минскому» субтипу вируса оказались вирусы, вызвавшие вспышку в 2002 г. в Молдове и циркулировавшие в 2003 г. в России. Все эти вирусы на филогенетическом древе образовывали общий кластер (рис.1). Среднее эволюционное расстояние между ними составило 0,048 ± 0,009 нуклеотидных замен/сайт.

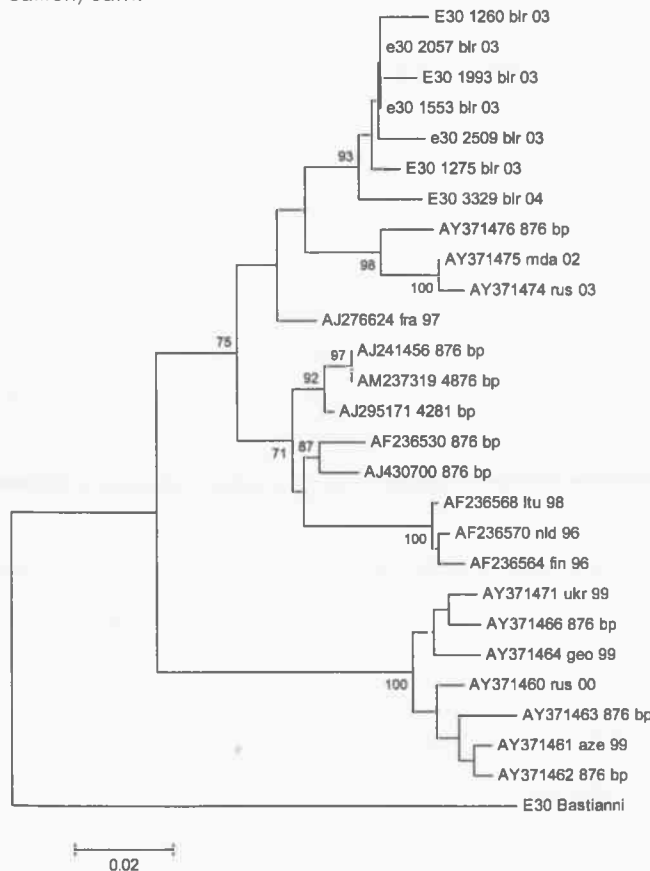


Рис.1. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа 27 нуклеотидных последовательностей вирусов ECHO 30, включающих фрагмент длиной 420 нуклеотидов, локализованный в 3'VP1 регионе генома ЭВ. Числа в узлах древа показывают процент псевдореплик по результатам бутстреппинга имеющих такую же топологию. Шкала (внизу, слева) отражает эволюционное расстояние

Данные литературы свидетельствуют о многочисленных вспышках, вызванных вирусом ECHO 30 в 1996 – 2000 гг. в странах Западной и Восточной Европы. Исходя из этого, в анализ были включены нуклеотидные последовательности различных вирусов ECHO 30, выделенных в этом регионе. Полученные результаты показали, что вирусы, выделенные от больных в Минске в 2003-04 гг. и циркулировавшие в Европе, входили в 2 различных монофилетических кластера, что указывает на их принадлежность к разным генетическим субтипам. Среднее эволюционное расстояние между кластерами, однако, оказалось не очень значительным и составило 0,066±0,011 нуклеотидных замен/сайт. На основании филогенетической реконструкции можно предположить, что эти 2 субтипа вирусов принадлежат к одной и той же линии и имеют гипотетического общего предка (достоверность топологии – 75%). Наиболее эволюционно-удаленными при сравнении с вирусами ECHO 30, выделенными в Минске в 2003-04 гг., оказались вирусы, циркулировавшие в 1999-2000гг. в регионе, лежащих к юго-востоку от нашей страны. Так, эволюционное расстояние между «минскими» изолятами ECHO 30, и вирусами, выделенными в 1999-2000гг в Украине, Грузии, Азербайджане, а также Ставропольском крае России, составило 0,12±0,017 нуклеотидных замен/сайт.

Молекулярно-эпидемиологические исследования вирусов ECHO 6. Исследования проводили на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 3-х изолятов вирусов ECHO 6, выделенных на территории г. Минска от больных ЭВИ. Два из этих изолятов были выделены в период вспышки ЭВИ в 2003 г. и один – во время эпидемического подъема заболеваемости в 2004 г. Для сравнения были использованы 18 нуклеотидных последовательностей вирусов ECHO 6, циркулировавших на территории Европы и Азии, в том числе – вирусы, выделенные во время вспышек в Бельгии, в 2002 г. и во Франции, в 2005 г. Кроме этого в анализ были включены нуклеотидные последовательности вирусов ECHO 6, выделенные в тот же период времени (2003-04 гг.) в Японии. Эти вирусы были выделены в отсутствие вспышек и являлись причиной спорадических случаев различных форм ЭВИ, а также были изолированы от здоровых людей. Помимо этого, в анализ были включены два изолята ECHO 6, выделенные в России. Авторы нуклеотидных последовательностей этих изолятов не указывают на их связь с какими-либо вспышками ЭВИ.

Как видно из рисунка 2, все нуклеотидные последовательности, использованные для филогенетического анализа, объединились в 3 основные группы. Статистическая достоверность такой топологии древа достаточно высока: значения бутстреппинга для всех этих групп составили 91-98%. В первую группу вошли изоляты ECHO 6, выделенные в 2003-04 гг. в Японии, во вторую – вирусы ECHO 6, выделенные в тот же период времени в Минске и вирус, выделенный в России в 1999г., третью группу составили вирусы, вызвавшие вспышки в Бельгии в 2002г. и Франции в 2005г.

Анализ вирусов ECHO 6, выделенных от больных в г.Минске в 2003-04г., показал их относительную гетерогенность. Так, эволюционное расстояние между вирусами, выделенными во время вспышки ЭВИ в г.Минске в 2003г. (№№ E6 2053 by 03 и E6 2341 by 03) составило 0,03±0,014 нуклеотидных замен/сайт. Если проанализировать аналогичные данные для изолятов ECHO 6, выделенных во время вспышки во Франции в 2005г., следует отметить, что вирусы, изолированные от больных из одного и того же населенного пункта (AM236969 и AM236973, 2005г., Париж), характе-

ризовались значительно меньшей гетерогенностью: эволюционное расстояние между ними составляло лишь 0,006 нуклеотидных замен/сайт. Даже с учетом изолята AM236969, который был выделен в другом географическом регионе Франции, среднее эволюционное расстояние между вирусами, выделенными во время вспышки ЭВИ в 2005г. во Франции было меньше, чем между вирусами, выделенными в 2003г. в г.Минске (0,024 и 0,03 нуклеотидных замен/сайт, соответственно). Таким образом, можно сделать вывод о том, что одной из особенностей вспышки ЭВИ в г.Минске в 2003г. была генетическая гетерогенность вызвавших ее вирусов ECHO6.

Далее было проведено сравнение вирусов ECHO 6, выделенных в г.Минске в 2003г. и 2004г. Как видно из рисунка 2, вирус ECHO 6, выделенный в 2004г. (№ 3094 By 04), группировался вместе с одним из изолятов, выделенных во время вспышки ЭВИ в 2003 г. (№ E6 2341 by 03). Эволюционное расстояние между этими двумя вирусами составило $0,012 \pm 0,008$ нуклеотидных замен/сайт. Если сравнить этот показатель с эволюционным расстоянием между изолятами 2003г. (0,03 нуклеотидных замен/сайт), видно, что вирус ECHO6, выделенный в 2004г. был значительно ближе к одному из изолятов 2003г., чем ECHO 6, выделенные в один и тот же период времени. На основании этих данных, а также результатов филогенетической реконструкции (рис.2), можно утверждать, что во время вспышки 2003г. среди населения Минска циркулировали 2 группы вирусов ECHO 6. К одной из этих групп принадлежал изолят № e6 2341 by 03, к другой-№ E6 2053 by 03. В 2004г. продолжалась циркуляция вирусов первой группы, к которой можно отнести вирус ECHO 6 №3094 by 04, тогда как циркуляция второй группы обнаружена не была.

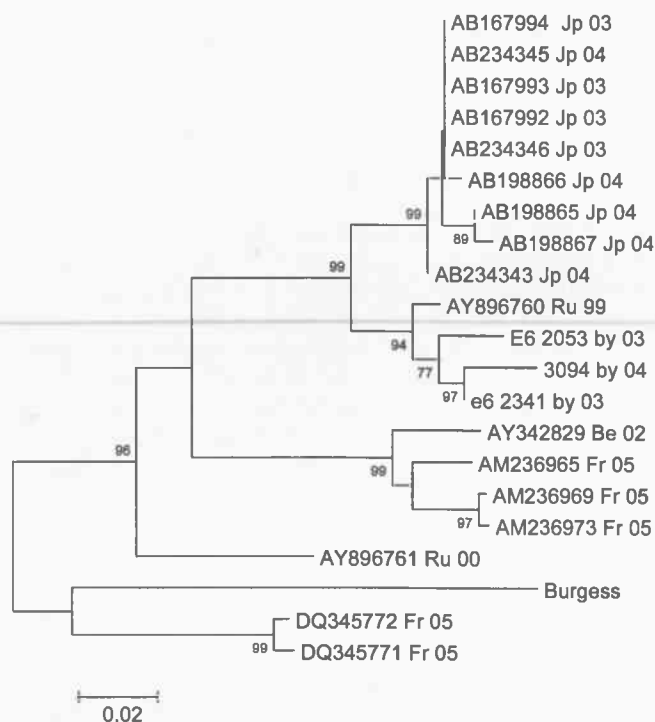


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа 21 нуклеотидных последовательностей вирусов ECHO 6, включающих фрагмент длиной 230 нуклеотидов, локализованный в 3'VP1 регионе генома ЭВ. Числа в узлах древа показывают процент псевдореплик по результатам бутстреппинга имеющих такую же топологию. Шкала (внизу, слева) отражает эволюционное расстояние

Как уже упоминалось, в одну из трех основных монофилетических групп помимо вирусов ECHO 6, выделенных в г.Минске в 2003-04гг., вошел также вирус, выделенный в России в 1999 г. Достоверность такого группирования на филогенетическом древе была весьма высокой – 94%. Данный изолят был наиболее близок к «минским» штаммам ECHO 6. Максимальное эволюционное расстояние между ним и вирусами, выделенными в Минске, составило $0,042 \pm 0,016$ нуклеотидных замен/сайт. Таким образом, на основании результатов молекулярно-эпидемиологического анализа, российский штамм вируса ECHO 6 AY896760, циркулировавший в 1999г. можно отнести к той же группе вирусов, которая вызвала вспышку в Минске в 2003г.

Продолжая сравнение вирусов ECHO6, выделенных в нашей стране и за рубежом, следует отметить, что вирусы, выделенные в Минске в 2003-04гг. и в России в 1999г. принадлежали к той же линии вирусов, которые циркулировали в Японии в аналогичный период времени. На это указывают результаты филогенетической реконструкции (рис.2): 2 большие группы вирусов (1-я включает изоляты, выделенные в Японии, 2-я – минские вирусы ECHO 6 2003-04 гг.) с достоверностью 99% имели гипотетического общего предка. При этом вирусы ECHO 6, выделенные в Европе (Франция, Бельгия), являются эволюционно более далеко отстоящими от минских изолятов 2003-04гг.

Молекулярно-эпидемиологические исследования вирусов Коксаки В5. Для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований в отношении вирусов Коксаки В5 проводился сравнительный анализ 2-х изолятов вирусов, выделенных в г. Минске в 2003 и 2005гг. Один из этих изолятов был выделен во время вспышки ЭВИ от больного серозным менингитом (№1841 By 03), а второй – в 2005г. от больного с ЭВИ, у которого впоследствии развился миокардит. С целью установления филогенетических взаимоотношений этих вирусов с изолятами Коксаки В5, выделенными в других странах, в анализ были включены также 22 нуклеотидные последовательности вирусов Коксаки В5 и 1 нуклеотидная последовательность вируса везикулярной болезни свиней (рис.3). В качестве прототипных штаммов использовали не только прототипный штамм Коксаки В5 Faulkner, но также штамм вируса везикулярной болезни свиней HongKong. Это связано с тем, что, как было установлено ранее, все циркулирующие в мире вирусы Коксаки В5 делятся на две большие группы, принадлежащие к двум различным генетическим линиям вируса. Одна из этих линий является эволюционно родственной прототипным вирусам Коксаки В5, обнаруженным восточно у людей, тогда как другая имеет эволюционную связь с вирусом везикулярной болезни свиней.

Филогенетическая реконструкция эволюционных взаимоотношений изолятов Коксаки В5, выделенных в Минске в 2003г. и 2005г., показала, что эти 2 изолята принадлежат к двум разным генетическим линиям вируса (рис.3).

Изолят вируса № 1841 By 03, выделенный от больного серозным менингитом во время вспышки ЭВИ в 2003г., со 100% статистической достоверностью группировался на дендрограмме вместе с прототипным штаммом Коксаки В5 Faulkner, тогда как изолят № 4052 By 05, выделенный от больного ЭВИ в 2005г. принадлежал к той же генетической линии, что и вирус везикулярной болезни свиней (достоверность топологии древа – 72%). Эволюционное расстояние между изолятом Коксаки В5 № 1841 By 03 и прототипным штаммом Faulkner составило $0,104 \pm 0,023$ нуклеотидных замен/сайт, а между изолятом Коксаки В5 № 4052 By 05 и прототипным штаммом Faulkner – $0,224 \pm 0,026$ нукле-

отидных замен/сайт. С другой стороны, эволюционное расстояние между изолятом Коксаки В5 № 4052 Ву 05 и прототипным штаммом вируса везикулярной болезни свиней HongKong составило всего $0,169 \pm 0,03$ нуклеотидных замен/сайт. Таким образом, изолят вируса Коксаки В5 № 4052 Ву 05 должен быть отнесен к той же генетической линии, что и вирус везикулярной болезни свиней.

Принадлежность двух исследуемых изолятов вируса Коксаки В5, выделенных в 2003г. и 2005г. в Минске к двум различным крупным эволюционным линиям явилась причиной значительных различий между этими изолятами. Так, эволюционное расстояние между ними составило $0,257 \pm 0,041$ нуклеотидных замен/сайт, что даже немного выше порогового значения генетического определения серотипа ЭВ ($0,25$ нуклеотидных замен/сайт). Исходя из этого, дальнейший анализ изолятов Коксаки В5 проводился по отдельности в пределах тех эволюционных линий, к которым принадлежали эти изоляты.

Вirus Коксаки В5 № 1841 Ву 03, выделенный от больного серозным менингитом во время вспышки ЭВИ в г. Минске в 2003г. на дендрограмме входил в одну группу с вирусами этого же серотипа, выделенными с 1997г. по 2003г. в различных странах Западной Европы. Достоверность такой топологии составила 92%. Группа является достаточно гомогенной-среднее эволюционное расстояние между вирусами Коксаки В5, вошедшими в ее состав не превышало $0,025 \pm 0,006$ нуклеотидных замен/сайт. Интересно, что помимо «минского» изолята вируса Коксаки В5, который был выделен во время крупной вспышки ЭВИ, все остальные изоляты, входящие в данную группу были выделены либо от больных со спорадическими случаями ЭВИ, либо от асимп-

томатических пациентов. На основании этих данных можно предположить, что вирус Коксаки В5 не играл ключевую роль во время крупной вспышки инфекции в г. Минске в 2003г. Данное предположение косвенно подтверждает тот факт, что от больных, у которых было зарегистрировано тяжелое течение ЭВИ, в том числе от больных острым миокардитом, вирус Коксаки В5 не выделялся.

Принципиально иная ситуация имела место при анализе изолята Коксаки В5 № 4052 Ву 05, выделенного в г. Минске в 2005г. от больного ЭВИ, у которого впоследствии развился миокардит. Данный изолят входил в общий монофилетический кластер с вирусами Коксаки В5, которые явились причиной вспышек ЭВИ во Франции в 2005г. и серозного менингита в Китае в 2002г. Достоверность такой топологии была весьма высокой и составила 98%. Эволюционное расстояние между изолятами в пределах данного кластера также было невелико и составляло $0,023 \pm 0,006$ нуклеотидных замен/сайт. Исходя из этого, можно предположить, что, несмотря на отсутствие вспышки ЭВИ в 2005г., субтип вируса Коксаки В5, циркулировавший в этот период в Минске, к которому и принадлежал исследуемый изолят № 4052 Ву 05, характеризовался более высокой патогенностью, чем субтип, циркулировавший во время вспышки ЭВИ в 2003г.

Таким образом, проведенные молекулярно-эпидемиологические исследования позволили выяснить генетические характеристики вирусов ЕСНО 30, ЕСНО 6 и Коксаки В5, которые являлись доминирующими возбудителями ЭВИ среди населения г. Минска в 2003-2005гг.

Установлено, что вспышка ЭВИ в 2003г. была вызвана вирусами ЕСНО 30, принадлежавшими к генетическому субтипу, отличавшемуся от того, который циркулировал в 1996-2000гг. на территории Западной Европы. Этот же субтип вируса вызвал вспышку ЭВИ в Молдове в 2002г., что указывает на его высокую вирулентность и контагиозность. В следующем 2004 г. в г. Минске продолжалась циркуляция того же генетического субтипа ЕСНО 30. Это определило особенности возрастной структуры заболевших (дети первых года-двух лет жизни, не контактировавшие с вирусом в 2003г.) и более низкие показатели заболеваемости (80 на 100 тыс. в 2003г. и 29 на 100 тыс. в 2004г.).

В отличие от вирусов ЕСНО 30, популяция вирусов ЕСНО 6, циркулировавших среди населения Минска во время вспышки 2003г., характеризовалась значительной гетерогенностью и включала вирусы, принадлежащие, по меньшей мере, к 2-м генетическим вариантам. Причем циркуляция одного из этих вариантов продолжалась и в 2004г. Другой генетический вариант, по-видимому, элиминировался из человеческой популяции. Наиболее близким к минским штаммам ЕСНО 6 2003-2004гг. был штамм вируса, обнаруженный в России в 1999г. Все эти вирусы ЕСНО 6 можно отнести к одному генетическому субтипу. Данный субтип относится к той же линии вируса, которая циркулировала в 2003-2004гг. в Японии. Вирусы ЕСНО 6, вызвавшие вспышки в 2002г. в Бельгии, а также в 2005г. во Франции относились к другой линии вируса и были наиболее эволюционно удаленными от минских изолятов вируса ЕСНО 6.

Вирусы Коксаки В5, являвшиеся причиной заболеваемости ЭВИ в 2003г. 2005г. принадлежали к двум различным крупным генетическим линиям вируса. Вирус, циркулировавший во время вспышки в 2003г., эволюционно был более близок к прототипному штамму вируса Коксаки В5, тогда как вирус, выделенный в 2005г., имел большую степень эволюционного родства с вирусом везикулярной болезни свиней. Вспышечный вирус Коксаки В5 принадле-

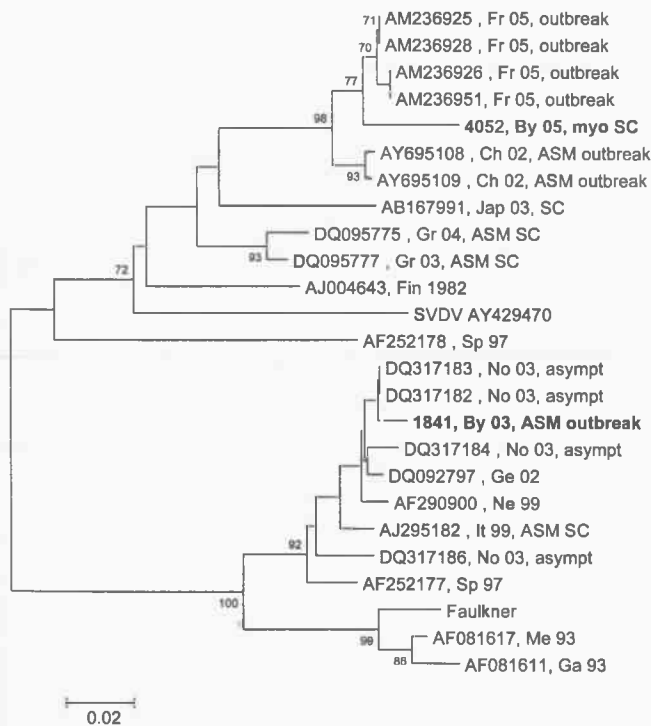


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа 26 нуклеотидных последовательностей вирусов Коксаки В5, включающих фрагмент длиной 305 нуклеотидов, локализованный в 3'VP1 регионе генома ЭВ. Числа в узлах древа показывают процент псевдореплик по результатам бутстреппинга имеющих такую же топологию. Шкала (внизу, слева) отражает эволюционное расстояние

☆ Военная эпидемиология и гигиена

жал к субтипу, циркулировавшему в странах Западной Европы начиная с 1997г. и вплоть до 2003г. Данный субтип не был связан со вспышками ЭВИ на территории его циркуляции и, в большинстве случаев, не являлся возбудителем заболевания. Эти данные позволяют предположить, что он характеризовался низкой степенью вирулентности и, по видимому, не играл ключевой роли во время вспышки инфекции в г. Минске в 2003г.

Литература

1. Амвросьева, Т.В. Поклонская, Н.В., Богуш, З.Ф. и др. Клинико-эпидемиологические особенности и лабораторная диагностика энтеровирусной инфекции в Республике Беларусь. //ЖМЭИ. — 2005. — № 2. — С.20 – 25.
2. Амвросьева, Т.В., Богуш, З.Ф., Казинец, О.Н. и др. Вспышка энтеро-

вирусной инфекции в г. Витебске в условиях загрязнения питьевой воды энтеровирусами / Вопр. вирусологии.-2004.-№1. — С.30-34.

3. Руководство по вирусологическим исследованиям при полиомиелите. Москва, 1997

4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W. et.al. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. — 1990. — V.215. — P. 403 – 410.

5. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. // J Mol Evol.-1980. — V. 16. — P. 111-120.

6. Kumar, S, Tamura, K, Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. — 2004. — V. 5. — P. 150-163.

7. Oberste, S., Maher, K., Kilpatrick, D. et.al. Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — V. 37, No. 5. — P. 1288 – 1293.

8. Saitou, N, Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol Biol Evol. — 1987. — V. 4. — P. 406 – 425.