

На правах рукописи

Морозова Ольга Владимировна

**Генотиповое разнообразие и филодинамика циркулирующих
на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами**

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник здравоохранения
Новикова Надежда Алексеевна

Официальные оппоненты:

Альховский Сергей Владимирович, доктор биологических наук, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, лаборатория биотехнологии, руководитель;

Подколзин Александр Тихонович, доктор медицинских наук, профессор, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, заместитель директора по эпидемиологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Защита состоится 24 июня 2021 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечников» по адресу: 105064, Москва, Малый Казённый переулок, д. 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, <http://www.instmech.ru>

Автореферат разослан «___» мая 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

И.В. Яковлева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ротавирусы вида А (РВА, *Rotavirus A*, род *Rotavirus*, семейство *Reoviridae*, подсемейство *Sedoreovirinae*, порядок *Reovirales*), до настоящего времени являются одной из основных причин острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни [Bishop et al., 1976; Tate et al., 2012; Ogilvie et al., 2011; Steele et al., 2019]. В мире, в довакцинальный период 1986-2006 гг., ротавирусы ежегодно вызывали более 111 миллионов случаев гастроэнтерита, которые не требовали консультации терапевта, 25 миллионов случаев, требовавших визита в клинику, 2 миллиона госпитализаций и 453 тысячи смертей детей младшего возраста [Ogilvie et al., 2011; Tate et al., 2012].

В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции в мире нашли широкое применение две вакцины: пентавалентная реассортантная (RotaTeq®, RV5) и моновалентная человеческая аттенуированная вакцина (Rotarix®, RV1) [Ciarlet et al., 2009; Ward et al., 2009]. В ряде стран применяют региональные вакцины на основе реассортантных или моновалентных аттенуированных штаммов животных и человека [Soares-Weiser et al., 2019; Dang et al., 2012; Fu et al., 2012; Naik et al., 2017; Vines et al., 2018]. Массовая вакцинация, введенная в национальные календари более 100 стран, позволила существенно снизить количество смертей и тяжелых, требующих госпитализации, случаев ротавирусного гастроэнтерита (РВГЭ) [Peck et al., 2019; Steele et al., 2019; Burnett et al., 2020].

В Российской Федерации у детей в возрасте до 5 лет, находящихся на стационарном лечении по поводу острой кишечной инфекции, РВА являются причиной острого гастроэнтерита в 43 % случаев. В числе амбулаторных обращений РВГЭ составляет 31 %, достигая 75 % в некоторых регионах [Баранов и др., 2017]. По данным государственного доклада о санитарном благополучии за 2019 год, ущерб от ротавирусной инфекции составил 8 431 262,1 тыс. рублей, заняв шестое ранговое место. На территории России для профилактики ротавирусной инфекции зарегистрирована живая пентавалентная вакцина, применение которой регламентировано по эпидемическим показаниям¹. Отсутствие массовой вакцинации детского населения и медленное формирование коллективного иммунитета обуславливают ежегодный подъем заболеваемости РВГЭ. При этом, следует учитывать, что существующие вакцины даже при широком применении не останавливают циркуляцию и эволюцию вирусов и не исключают риск формирования штаммов с повышенной вирулентностью, репликативной активностью или контагиозностью. Все перечисленное выше может послужить причиной внезапных

¹ Приказ Минздрава России от 21.03.2014 №125н

эволюционных изменений в популяции возбудителя, что определяет важность слежения за генотиповым разнообразием ротавируса.

Вирион ротавируса представляет собой трехслойную частицу, образованную по принципам икосаэдральной симметрии, содержащую 11 сегментов двухцепочечной РНК, кодирующих шесть структурных белков (VP1-VP4, VP6, VP7) и пять или шесть неструктурных белков (NSP1-NSP5/6). Основными антигенами, формирующими протективный иммунитет после перенесенной ротавирусной инфекции, являются белки наружного капсида VP7 и VP4 [Estes et al., 2001]. Получены данные о роли VP6-антител в защите от тяжелого течения инфекции [Lappalainen et al., 2017; Caddy et al., 2020].

На свойствах двух протеинов наружного капсида вириона – VP7 (G – гликопротеин) и VP4 (P – протеазочувствительный) – основана бинарная номенклатура ротавирусов. В настоящее время идентифицированы 36 G- и 51 [P]-генотипов ротавируса, изолированных от животных и человека [Matthijnsens et al., 2011]. Большинство ротавирусов, инфицирующих человека, относятся к шести G[P] генотипам: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [Bányai et al., 2012; Matthijnsens et al., 2010; Santos et al., 2005]. На территории России, в том числе в Нижнем Новгороде, подавляющее большинство типированных РВА относятся к пяти генотипам: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] [Денисюк и др., 2017; Костинов и др., 2018; Акимкин и др., 2019; Ivashechkin et al., 2020]. В последнее время в мире стали выявлять новые, необычные и не характерные для территории нашей страны штаммы ротавируса, отличающиеся по антигенным свойствам от вакцинных [Moutelíková et al., 2019; Arana et al., 2019; Zeng et al., 2020]. Поскольку вакцинные штаммы были выделены более 30 лет назад, динамичная эволюция ротавирусной популяции делает актуальным, научно и практически значимым проведение молекулярного мониторинга циркулирующих ротавирусов, изучения их филодинамики и сравнительного анализа с вакцинными штаммами в области антигенных детерминант.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время в мире проводятся исследования, направленные на изучение влияния вакцинопрофилактики на заболеваемость РВГЭ [Burnett et al., 2018; Maguire et al., 2019; Burke et al., 2020]. Отечественными исследователями показана высокая эффективность вакцинопрофилактики ротавирусного гастроэнтерита с целью снижения числа тяжелых случаев течения инфекции и случаев, требующих госпитализации [Мартынова и др., 2016; Рудакова и др., 2017; Рычкова и др., 2018; Смирнова и др., 2018; Южакова и др., 2017; Феликсова и др., 2019; Горбунов и др., 2020].

Одним из ведущих направлений научных исследований является изучение генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих на разных территориях в условиях применения вакцин и при отсутствии вакцинопрофилактики [Simwaka et al., 2018; Malakalinga et al., 2019; Degiuseppe et al., 2020]. Для многих территорий Российской Федерации охарактеризован типовой состав ротавирусных популяций, выявлены доминирующие генотипы ротавируса [Денисюк и др., 2017; Костинов и др., 2018; Акимкин и др., 2019; Ivashechkin et al., 2020]. В Нижегородском НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной наблюдения за циркуляцией ротавирусов разных типов и их сменой проводятся на протяжении 36 лет [Novikova et al., 2012; Novikova et al., 2020].

У ротавирусов дикого типа, циркулирующих на территории ряда стран (Бельгия, Арабские Эмираты, Тунис, Финляндия, Индия, Иран, Аргентина и др.), выявлены филогенетические отличия от вакцинных штаммов, обнаружены мутации в области сайтов антигенной нейтрализации [Zeller et al., 2012; Abdel-Moneim et al., 2015; Mouna et al., 2013; Hemming et al., 2013; Kulkarni et al., 2014, Motamedi-Rad et al., 2020; Cuffia et al., 2016]. Однако, для штаммов ротавируса, изолированных на территории России, такая сравнительная характеристика не проводилась.

Целью работы является характеристика генетического разнообразия и расчет филодинамических параметров циркулирующих ротавирусов, их сравнение с вакцинными штаммами.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить типовой состав и дать молекулярно-генетическую характеристику популяции ротавируса вида А в Нижнем Новгороде в период 2016-2020 гг.
2. Дать филодинамическую характеристику нижегородских изолятов ротавируса с генотипами G4P[8] и G2P[4] на основе полного генома.
3. Установить нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 нижегородских ротавирусов.
4. Провести филогенетический анализ российских и вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix® на основе генов VP7, VP4, VP6 и NSP4.
5. Дать сравнительную характеристику выведенных аминокислотных последовательностей в регионах антигенных детерминант белков VP7, VP4, VP6 и NSP4 штаммов ротавирусов дикого типа и компонентов вакцин.

Научная новизна работы. Определен спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в новый, ранее не охарактеризованный период 2016-20 гг. Спектр включал 14 G[P]комбинаций: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8], G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]. Впервые показано доминирование

штаммов с генотипом G2P[4] в сезон 2018-19 гг. Впервые показана циркуляция на территории России штаммов ротавируса с генотипом E3 гена NSP4, на территории Нижнего Новгорода – ротавирусов генотипов G12 и G8 гена VP7.

При ретроспективном исследовании РВА, выявленных в 2013-14 гг., впервые показана циркуляция ротавируса с генотипом G1P[8]-I2-E2, имеющего «короткий» электрофоретип РНК (доля в генотиповой структуре 2,6 %), который является двойным межгрупповым реассортантом между Wa- и DS-1-подобными ротавирусами. Установлено родство данного варианта со штаммами, изолированными на территориях Японии и Таиланда. В 2019-20 гг. доля межгрупповых реассортантов в нижегородской популяции ротавируса составила 12,7 %.

Впервые определена полная нуклеотидная последовательность генома ротавирусов с генотипом G4P[8] и G2P[4], изолированных в России. На основе всех 11 сегментов генома проведен филогеографический анализ штаммов, позволивший установить их полифилетическое происхождение.

Установлены нуклеотидные последовательности генов VP7 (124), VP4 (48), VP6 (30) и NSP4 (15) новых российских (Нижний Новгород) штаммов РВА. Последовательности депонированы в GenBank, что расширяет международную базу данных нуклеотидных последовательностей генома ротавирусов вида А.

Выявлены аминокислотные различия в области нейтрализующих эпитопов белков VP7 и VP4 у вакцинных штаммов и российских ротавирусов с генотипами G1, G2, G3, G4, G9, P[8] и P[4]. У РВА в составе вакцины RotaTeq® установлено меньшее количество различий (в сравнении с вакциной Rotarix®) с российскими штаммами дикого типа ввиду ее поливалентности. Наибольшее количество различий показано в нейтрализующих эпитопах VP7 российских РВА генотипа G9. Установлена высокая консервативность эпитопов белка VP6 вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix® и штаммов ротавируса дикого типа.

Впервые проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных Т-клеточных эпитопов белков VP7, VP6 и NSP4, в ходе которого установлена вариабельность аминокислотного состава в области антигенных детерминант VP7. Показана консервативность Т-клеточных эпитопов белков VP6 и NSP4.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные о генотиповой структуре РВА в новый, не охарактеризованный ранее период времени, дополняют результат многолетних наблюдений за динамикой циркуляции ротавирусов разных типов, что имеет значение для понимания внутренних причин развития

эпидемического процесса при ротавирусной инфекции и оценке возможного воздействия вакцин на типовое разнообразие.

Установленные и депонированные в международной базе данных нуклеотидные последовательности генома ротавирусов могут быть использованы для установления места российских штаммов в мировой популяции.

Рассчитанные филодинамические характеристики вносят вклад в понимание эволюционных закономерностей, происходящих внутри популяции ротавируса, дают возможность оценки времени формирования эпидемически значимых вариантов, что позволяет совершенствовать эпидемиологический надзор за распространением этого патогена.

Результаты филогенетического анализа современных российских изолятов ротавируса вида А и вакцинных штаммов в составе RotaTeq® и Rotarix®, а также анализа аминокислотных последовательностей в области антигенных детерминант могут иметь значение при разработке отечественных вакцин.

Результаты обнаружения ротавирусов у детей, госпитализированных с острой кишечной инфекцией, оперативно сообщались в инфекционный стационар и ежемесячно направлялись в Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области, где использовались в официальной статистике инфекционной заболеваемости в Нижегородской области (Акты внедрения от 30 января 2019 и 20 января 2020).

Методология и методы исследования. Для достижения цели исследования в ходе выполнения работы были использованы молекулярно-генетические методы, такие как выделение РНК из клинического материала, постановка реакции обратной транскрипции, постановка полимеразной цепной реакции, секвенирование полученных фрагментов кДНК по Ф. Сэнгеру. Секвенирование полного генома было осуществлено с использованием технологии NGS, Illumina MiSeq. Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей, расчет гомологии, проводили с использованием программ MEGA5 и UGENE. Филогенетический и филогеографический анализы осуществляли с применением Байесовского подхода.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Типовая структура нижегородской популяции в 2016-20 гг. была представлена как минимум 14 G[P]-типами РВА и включала типичные штаммы Wa-подобной (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8]) и DS-1-подобной (G2P[4]) геногрупп и межгеногрупповые реассортанты (G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]).

2. Нижегородские штаммы с генотипами G4P[8] и G2P[4] несут типичные для представителей первой и второй геногрупп сочетания всех 11 генов и имеют полифилетическое происхождение.

3. Российские ротавирусы и штаммы вакцин RotaTeq® и Rotarix® по генам VP7, VP4, VP6 и NSP4, кодирующим основные протективные антигены, относятся к разным филогенетическим линиям.

4. Российские ротавирусы глобальных типов имеют отличия от вакцинных штаммов в эпитопах антигенной нейтрализации белков VP7 и VP4 и консервативны в антигенных сайтах белка VP6. В области линейных Т-клеточных эпитопов показаны аминокислотные замены для белка VP7 и консервативность белков VP6 и NSP4.

Апробация материалов диссертации.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- на 31-й ежегодной встрече Европейского общества по педиатрическим инфекциям, 28 мая – 1 июня 2013 г., Италия, Милан;

- на VI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 24-26 марта 2014 г., Москва;

- на VII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 30 марта – 1 апреля 2015 г., Москва;

- на VIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 28-30 марта 2016 г., Москва;

- на IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика», 18-20 апреля 2017 г., Москва;

- на X Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 26-28 февраля 2018 г., Москва;

- на 13-м ежегодном симпозиуме по исследованию ротавирусной инфекции, 29-31 августа 2018 г., Минск, Беларусь.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ в изданиях, индексируемых в РИНЦ, семь из них – в изданиях рекомендованных ВАК по специальности 03.02.02 вирусология, а также индексируемых в Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Материалы научно-квалификационной работы изложены на 173 страницах печатного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, основной части работы, в которой описаны полученные результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы, включающего 340 источников отечественных и зарубежных авторов, и приложения. Диссертация иллюстрирована 20 рисунками и 13 таблицами.

Вклад автора в диссертационную работу. Основные результаты, представленные в работе, получены автором лично. На разных этапах исследования в работе приняли участие Н.В. Епифанова, Т.А. Сашина, А.Ю. Кашников, С.Г. Фомина, В.В. Зверев, которым автор выражает искреннюю благодарность. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору Н.А. Новиковой.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

С целью выявления ротавирусов было исследовано 6100 образцов копроматериала детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острая кишечная инфекция. Обследование детей на группу кишечных вирусов проводилось с информированного согласия родителей.

Для проведения филогенетического анализа были использованы 217 нуклеотидных последовательностей фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и NSP4, полученных в данной работе, 1177 нуклеотидных последовательностей ротавирусов, изолированных на территории России и доступных в базе данных GenBank. Для проведения филогеографического исследования нижегородских изолятов на основе полного генома, было проанализировано более 26 000 нуклеотидных последовательностей всех 11 генов ротавирусов, изолированных как в нашей стране, так и за рубежом.

Выделение РНК ротавируса из клинического материала осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Обнаружение РНК ротавируса проводили с использованием набора реагентов для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (Rotavirus А), норовирусов 2 генотипа (Norovirus 2 генотип) и астровирусов (Astrovirus) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции по применению. Амплификацию и анализ результатов проводили на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия) в режиме реального времени.

Образцы биоматериала, содержащие РНК ротавируса (1661 образец), использовали для изучения возбудителя методами мультиплексной ПЦР и РНК-ПААГ.

Нуклеотидные последовательности кДНК фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 устанавливали с использованием специфических праймеров в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter SEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США), согласно рекомендациям производителя. Для двух нижегородских штаммов РВА методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina были определены полные нуклеотидные последовательности геномных сегментов. Для секвенирования использовали набор Nextera XT Sample Preparation kit (Illumina, США), анализ проводили с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов.

Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения MEGAX, UGENE [Kumar et al., 2018; Okonechnikov et al., 2012]. Филогенетический и филогенетический анализы были проведены с использованием пакета программ BEAST v.1.10.4 [Suchard et al., 2018]. Пространственную визуализацию полученных результатов на карте осуществляли в программах SPREAD v.1.0.6 и Google Earth. Визуализацию филогенетических деревьев проводили в программе FigTree v.1.4.4.

Анализ антигенных сайтов трехмерной модели глобулярного домена белка VP4 (VP8*) и тримера VP7 проводили с использованием программы Chimera [Pettersen et al., 2004].

Результаты и их обсуждение

1. Характеристика типовой структуры нижегородской популяции ротавируса

Спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в период 2016-2020 гг. На первом этапе исследования была дана характеристика спектра G[P]-типов РВА, циркулирующих в Нижнем Новгороде в 2016-20 гг. В этот период было исследовано 6100 образцов фекалий, полученных от детей до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с острой кишечной инфекцией. В среднем ротавирусы были обнаружены в 27,2 % случаев. В период 2016-17 гг. частота обнаружения ротавирусов составила 31,5 %, затем в сезон 2018-19 гг. произошло статистически значимое снижение этого показателя до 21,6 % ($p < 0,001$).

Образцы, содержащие РНК РВА, были типированы методами мультиплексной ПЦР и секвенированием на предмет выявления 12-ти наиболее распространенных в мире генотипов: G1, G2, G3, G4, G6, G8, G9, G12, P[4], P[8], P[6], P[9]. Типовая

структура популяции ротавируса на территории Нижнего Новгорода в 2016-20 гг. при отсутствии массовой вакцинации включала глобально распространенные генотипы: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8] и штаммы с необычными G[P] комбинациями: G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]. Ротавирусы с генотипом G6 в исследуемый период не были выявлены. Таким образом, зафиксировано снижение частоты обнаружения РВА с 31,5 % в 2016-17 гг. до 21,6 % в 2018-19 гг., на фоне снижения уровня обнаружения ротавирусов с генотипом G9 и увеличением доли РВА G2P[4].

Характеристика штаммов с генотипом G2P[4], изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг. Снижение частоты обнаружения ротавирусов и статистически значимое увеличение доли штаммов с генотипом G2P[4] в период 2018-19 гг. ($p < 0,001$), послужили основанием для молекулярно-генетического исследования РВ этого типа.

DS-1-подобные штаммы, т.е. РВА второй геногруппы, которые отличаются «коротким» профилем РНК в ПААГ, всегда представлены в типовой структуре РВА, однако, на территории России их вклад обычно составляет 2-8 % [Lobzin et al., 2017; Харит и др., 2017]. В нашей работе было показано, что в Нижнем Новгороде в период 2017-18 гг. доля штаммов с генотипом G2P[4] увеличилась до 22,9 %, а в следующий сезон составила 39,1 %.

Для филогенетического анализа ротавирусов с генотипом G2P[4] по генам VP7 и VP4 были секвенированы 10 образцов. Установлена их принадлежность к двум линиям по гену VP7 (G2-IVa-1 и G2-IVa-3) и двум линиям по гену VP4 (P[4]-IVa и P[4]-IVb). Аллели, которые несут нижегородские РВА, убиквитарны и встречаются по всему миру, в том числе и в России. Показано родство изучаемых штаммов 2018-19 гг. с РВА генотипа G2P[4], изолированными на территории Нижнего Новгорода ранее в 2016-18 гг., что позволяет говорить о возможных естественных причинах роста доли штаммов с генотипом G2P[4] в типовой структуре ротавируса.

Выявление и характеристика межгеногрупповых реассортантов. Ретроспективно, методами мультиплексной ПЦР и РНК-ПААГ были изучены штаммы ротавируса, выделенные в Нижнем Новгороде в 2013-14 гг. с генотипом G1P[8] и «коротким» профилем миграции сегментов в полиакриламидном геле. Всего было выявлено 8 таких образцов, четыре из которых секвенированы по генам VP7, VP4, VP6 и NSP4. Установлено, что изучаемые образцы относятся к генотипу G1P[8]-I2-E2, т.е. являются двойными межгеногрупповыми реассортантами. Филогенетический анализ позволил установить родство штаммов, изолированных в Нижнем Новгороде, с ротавирусами, выделенными на территориях Японии,

Таиланда, Австралии и ряда других стран, где они являлись причиной вспышек или доминировали среди детей с тяжелым течением ротавирусной инфекции.

Поиск межгеногрупповых реассортантов был продолжен в период 2016-20 гг. В 2016-17 гг., реассортанты составляли 1,1 % в типовой структуре РВА, тогда как в 2019-20 гг., доля таких штаммов увеличилась до 12,7 %. Одной из причин роста числа реассортантов между первой и второй геногруппами в генотиповой структуре ротавируса могла быть активизация циркуляции штаммов второй геногруппы, доля которых начала увеличиваться в 2017-18 гг.

Филодинамическая характеристика штаммов РВА с генотипами G4P[8] и G2P[4] на основе полного генома. В рамках характеристики популяции ротавируса, был проведен филодинамический анализ двух штаммов с генотипами G2P[4] и G4P[8] на основе всех 11 сегментов генома. Для определения сублинии внутри каждого генотипа, для каждого сегмента генома была использована классификация, предложенная ранее в ряде работ [Doan et al., 2011; Giammanco et al., 2014; Vok et al., 2002; Pradhan et al., 2018]. В результате анализа филодинамических характеристик показана аллельная принадлежность для каждого сегмента изученных штаммов: G4-1C/P[8]-3.6/11-4/R1-A2/C1-A1/M1-A1/A1-B/N1-A/T1-A2/E1-1/H1-A и G2-IV-3a/P[4]-IVb/I2-VII/R2-VII/C2-VIII/M2-V/A2-II/N2-II/T2-IV/E2-XII/H2-III. Полученные данные позволяют сделать заключение, что изучаемые изоляты являются типовыми представителями первой и второй геногруппы, соответственно, и встречаются повсеместно.

В ходе анализа была установлена скорость мутаций для каждого сегмента генома, которая составила: $4.5E-4 - 2.8E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для штамма G4P[8] и $7.51E-4 - 1.81E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для РВА с генотипом G2P[4].

Ближайший общий предок штамма с генотипом G4P[8] циркулировал в 2001-2012 гг., в зависимости от анализируемого гена. Для штамма с генотипом G2P[4] ближайший общий предок датируется в диапазоне 2006-2013 гг.

Поскольку ротавирус имеет сегментированный геном, реконструкция пространственно-временного происхождения исследуемых штаммов на основе отдельных выборок нуклеотидных последовательностей была произведена отдельно для каждого сегмента. Для того чтобы подтвердить связь между исследованными штаммами и предполагаемым географическим происхождением, был рассчитан фактор Байеса, при значении которого >3 можно говорить о достоверной эпидемической связи. В ходе работы показано, что для штамма с генотипом G4P[8] наиболее вероятные географические локации ближайшего общего предка были: Россия (VP7, VP4, VP6), Китай (VP1), Таиланд (VP3), Бельгия (NSP1), Венгрия (VP2, NSP2, NSP3), Италия (NSP4) и Япония (NSP5) (Рисунок 1).



Рисунок 1. Географическая констелляция генов G4P[8] (А) и G2P[4] (Б) штаммов РВА, изолированных на территории России.

Для штамма с генотипом G2P[4]: Индия (VP7, VP4, VP6, NSP1, NSP4), Малави (VP2, NSP2, NSP3), Австралия (VP1), Италия (NSP5) и Бангладеш (VP3).

Таким образом, исследованные ротавирусы с генотипом G2P[4] и G4P[8], изолированные на территории Нижнего Новгорода, несут типовые аллели генов первой и второй геногрупп. Данные, полученные на основе байесовского анализа свидетельствуют о полифилетическом происхождении сегментов генома.

2. Филогенетические взаимоотношения вакцинных штаммов и ротавирусов глобальных генотипов, циркулирующих на территории России

Ротавирусная популяция отличается сложной генотиповой и антигенной структурой. Ряд исследований показывает, что штаммы РВА одного генотипа, несущие разные аллели генов, могут обладать разными антигенными свойствами, тем самым потенциально позволяя вирусу избегать иммунного ответа [Arista et al., 2006; Bányai et al., 2009; Hoshino et al., 2004; Jin et al., 1996]. В связи с этим, научно-практический интерес представлял филогенетический анализ вакцинных и диких штаммов ротавируса на основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих протективные антигены.

Рядом авторов предложено разделение штаммов на линии внутри наиболее распространенных генотипов VP7, VP4, VP6 и NSP4, однако устоявшейся классификации аллелей не существует. Выделение линий базируется на основе кластеризации достоверных паттернов дендрограммы, сконструированной на основе нуклеотидных последовательностей. Филогенетическое дерево строят с использованием методов максимального правдоподобия или объединения ближайших соседей и выделяют аллели, при поддержке бутстрапа в 70-100 %. При этом, уровень нуклеотидных различий не является ориентиром и может варьировать между аллелями внутри одного генотипа. В нашей работе мы придерживались разделению рассмотренных генотипов VP7 и VP4 на линии, предложенному в работах: Phan et al., 2007; Giammanco et al., 2014; Wang et al., 2014; Bok et al., 2002; Badaracco et al., 2013; Arista et al., 2006. Линии внутри генотипов I1–I2 гена VP6 и E1–E2 гена NSP4 были выделены в нашей работе.

VP7. В анализ были взяты 124 нуклеотидные последовательности, полученные в данной работе, и 346 последовательностей РВА, изолированных в других регионах России. Установлено, что российские РВА несут 12 аллелей гена VP7 восьми генотипов: G1-1 и G1-2c; G2-IVa-1 и G2-IVa-3; G3-3a, G3-3e и G3-1; G4-1c; G9-III, G9-IVe; G12-3; G6-I; G8, что отличает их от вакцинных аллелей гена VP7: G1-2a (Rotarix®), G1-3, G2-II, G3-3d, G4-1a, G6-IV (RotaTeq®) (Рисунок 2).

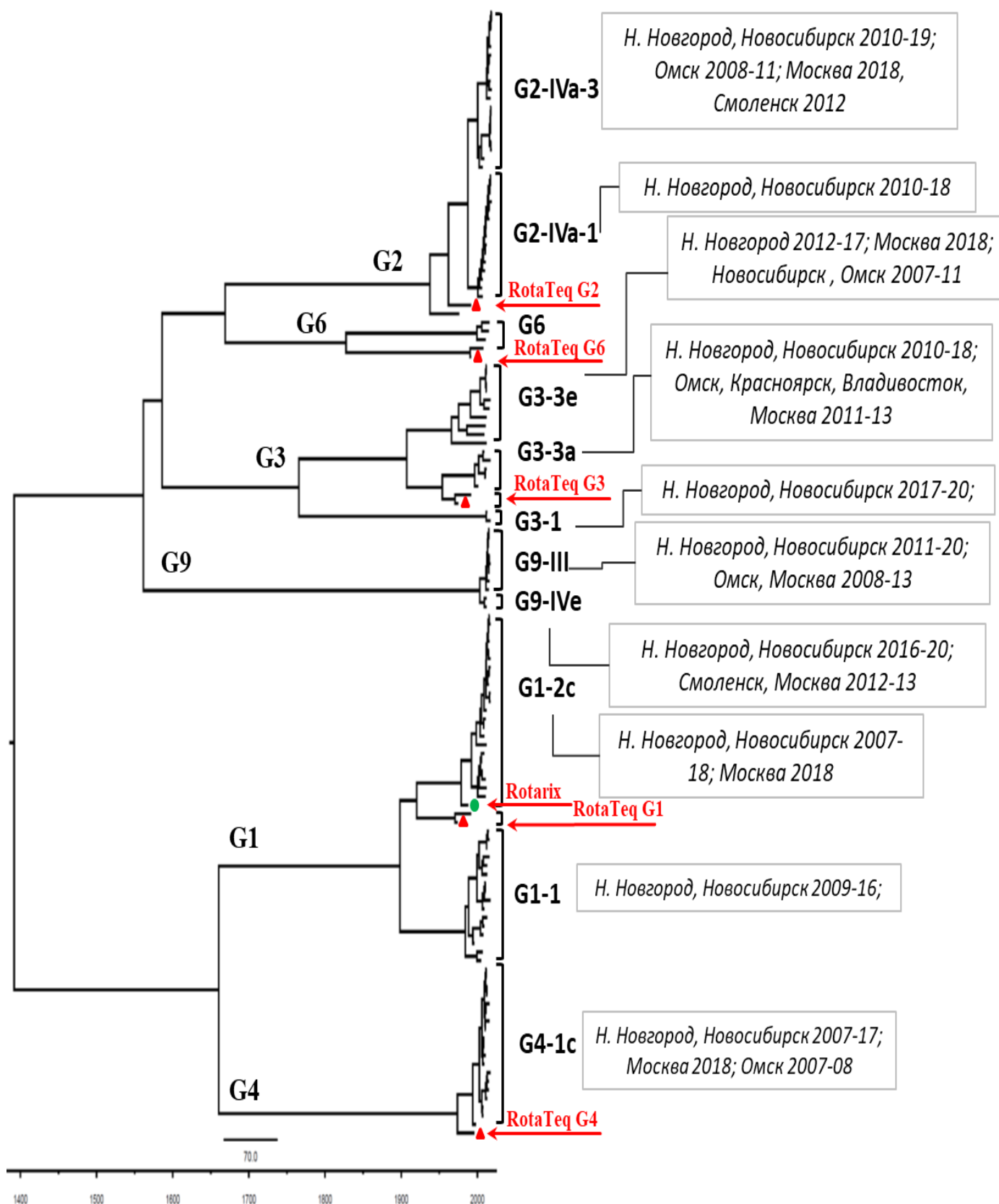


Рисунок 2. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 генотипов G1, G2, G3, G4, G6 и G9 российских РВА и вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix®.

VP4. Филогенетический анализ на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена VP4 был проведен с использованием 48 последовательностей, полученных в данной работе, и 480 последовательностей, изолированных в других регионах России и доступных в базе данных GenBank. Было установлено, что российские ротавирусы несут шесть аллелей гена VP4 четырех генотипов: P[8]-3, P[8]-4, P[4]-IVa, P[4]-IVb, P[6], P[9], в отличие от вакцинных штаммов, имеющих аллели P[8]-1 (Rotarix®) и P[8]-2 (RotaTeq®) (Рисунок 3).

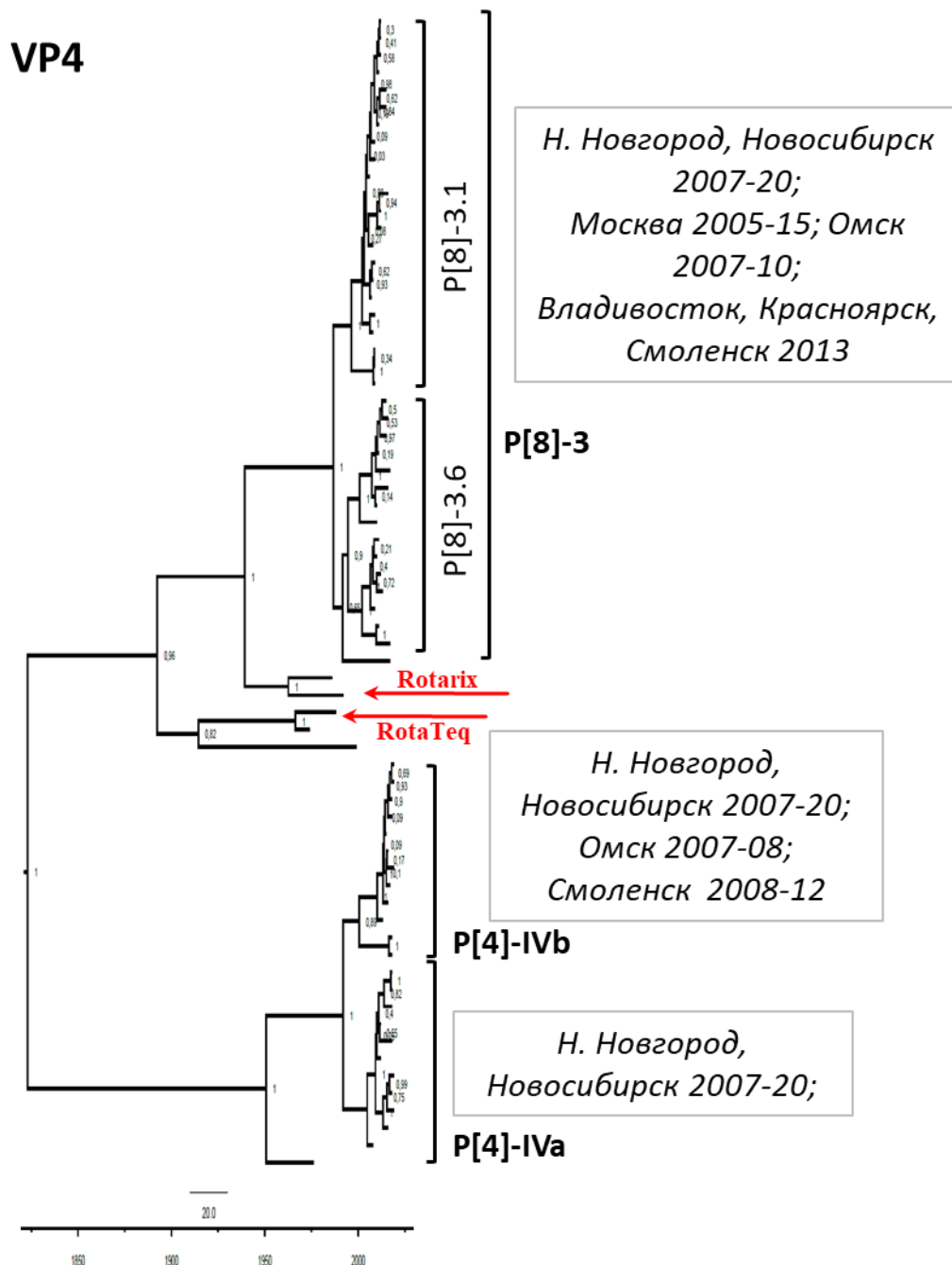


Рисунок 3. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена VP4 (домен VP8*) генотипов P[4] и P[8] РВА российских и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq®.

NSP4. Для изучения разнообразия аллелей гена NSP4 современных российских штаммов РВА и их взаимоотношений с вакцинными штаммами, была изучена выборка, в которую вошли 89 нуклеотидных последовательностей российских РВА, из которых 15 получены в данной работе. Анализ гена NSP4 позволил установить, что российские штаммы несут восемь вариантов гена NSP4: E1-1, E1-2, E1-3, E2-1, E2-2, E2-3, E2-4, E3. Штаммы в составе вакцины RotaTeq® образовали отдельный кластер E2-5, в который не вошли российские изоляты, представленные в базе данных GenBank. Штамм вакцины Rotarix® несет аллель E1-1, который, однако, кластеризуется отдельно от российских вариантов дикого типа, принадлежащих этой же линии (Рисунок 4).

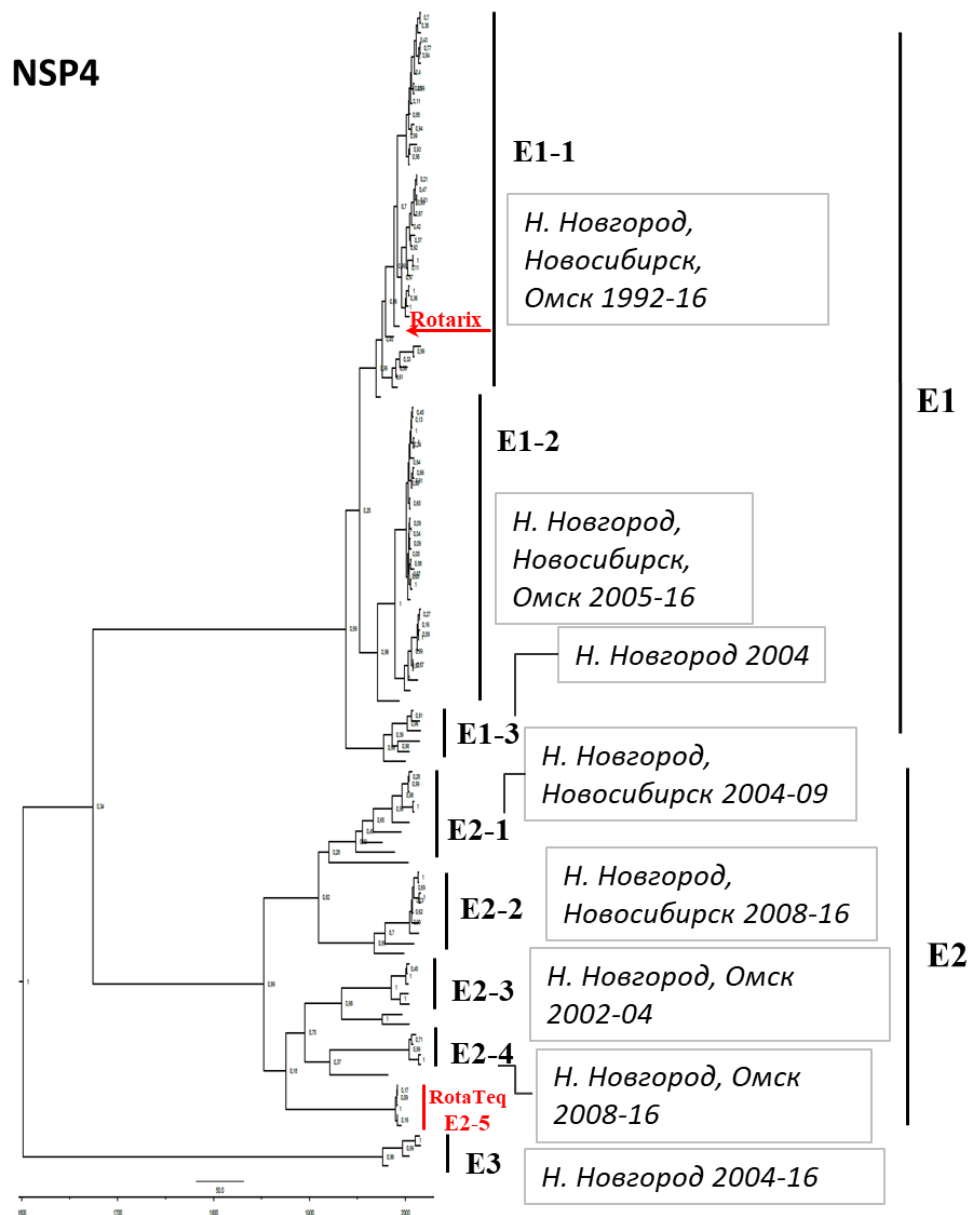


Рисунок 4. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена NSP4 российских РВА дикого типа и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq®.

VP6. Белок внутреннего капсида ротавириона VP6, индуцирующий иммунный ответ, все чаще рассматривается как потенциальный кандидат для создания вакцины против ротавирусной инфекции, что послужило основанием для более детального изучения его филодинамических характеристик.

Для изучения разнообразия аллелей гена VP6 российских ротавирусов, была составлена выборка из 262 последовательностей гена РВА, изолированных на территории России, в том числе 30 полученных в данной работе.

В ходе филогенетического анализа показана циркуляция на территории России ротавирусов двух генотипов (I1 и I2) гена VP6. Внутри каждого генотипа достоверно выделены три линии. Большинство российских РВА принадлежат линиям I1-1, I2-1, I2-3. С вакцинными штаммами RotaTeq® и Rotarix® (относятся к линиям I2-2 и I1-2, соответственно) кластеризовались единичные российские изоляты, выделенные в Новосибирске в 2010 году и не получившие широкого распространения (Рисунок 5А).

На основе байесовского подхода, были рассчитаны такие филодинамические характеристики как скорость накопления мутаций, время циркуляции ближайшего общего предка (tMRCA), эффективный размер популяции (N_e). Установлено, что скорость накопления мутаций у генотипа I2 ($1,008E-3$ нуклеотидов на сайт в год), немного выше, чем у генотипа I1 ($7,732E-4$ нуклеотидов на сайт в год). Кроме этого, для каждой сублинии установлена дата циркуляции ближайшего общего предка, которая, в зависимости от аллеля, варьировала от 1910 года до 1992 года.

С использованием непараметрической коалесцентной модели SkyGrid рассчитан эффективный размер популяции. Этот параметр позволяет оценить генетическое разнообразие популяции во времени на основе анализируемых геномных данных. Графики демографической истории, реконструированные на основе нуклеотидных последовательностей гена VP6 российских ротавирусов с использованием модели SkyGrid и Байесовского анализа показывают, что обе популяции характеризуются долговременными стабильными показателями. Ротавирусы с генотипом I1 имели тенденцию к небольшому росту эффективного размера популяции, а затем, на уровне 2000 года, произошло снижение этого показателя. РВА с генотипом I2 аналогично показали небольшое снижение эффективного размера популяции после 2000 года (Рисунок 5Б). Снижение эффективного размера популяции РВА после 2000х годов свидетельствует о снижении генетического разнообразия гена VP6.

Филогенетическое разнообразие и филодинамические характеристики российской популяции РВА позволяют сделать вывод о долговременной стабильности и консервативности гена VP6 генотипов I1 и I2.

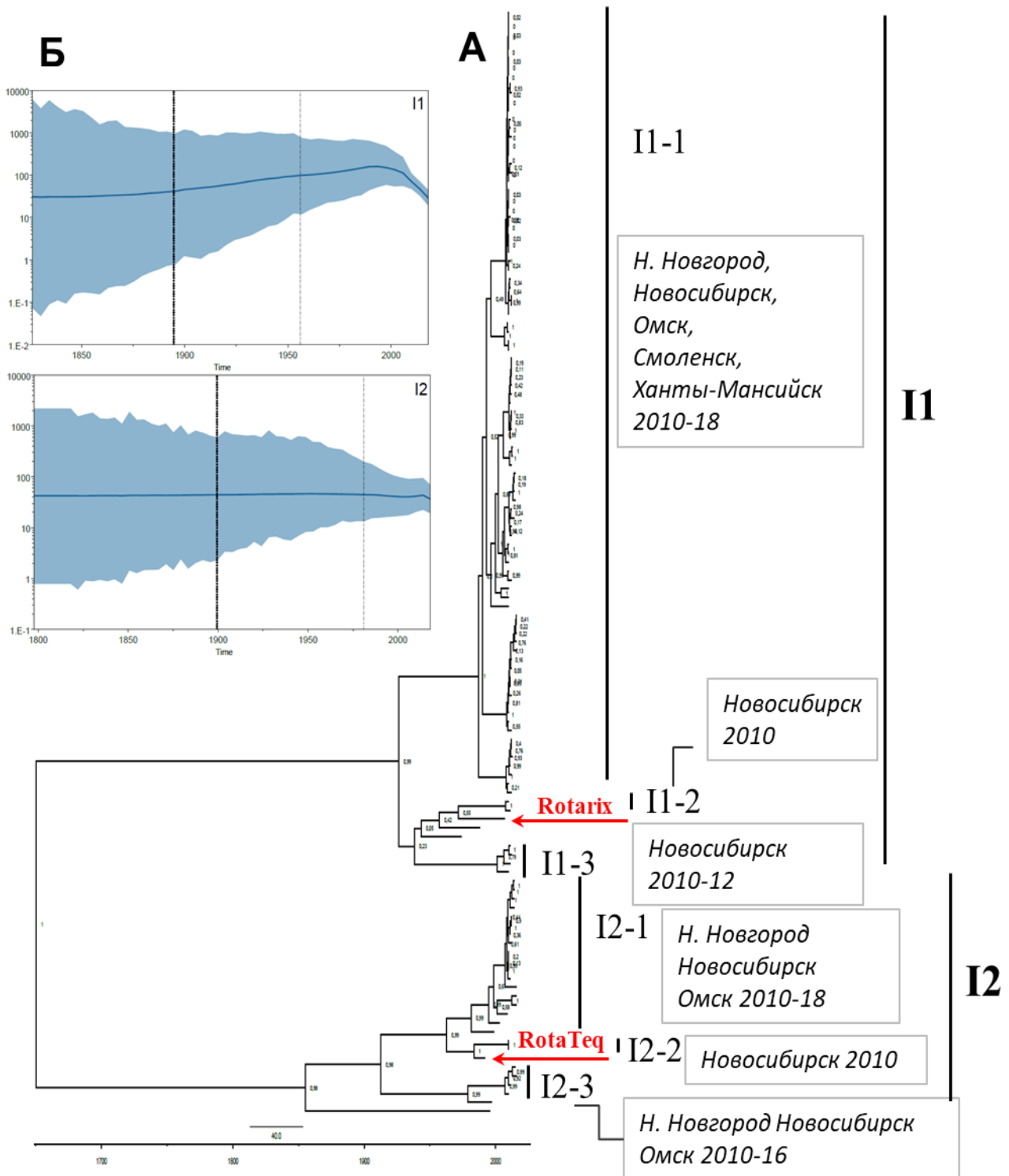


Рисунок 5. А - Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP6 нижегородских РВА дикого типа и вакцинных штаммов RotaTeq®, Rotarix®;

Б - Демографическая история гена VP6 генотипов И1 и И2. По оси у показан эффективный размер популяции вируса (N_e), представляющий количество геномов, эффективно способствующих возникновению новых инфекций. По оси x отложено время в календарных годах. Линия в центре отображает медианные значения в рамках 95% интервала заданной плотности.

Анализ антигенных эпитопов вакцинных и российских штаммов РВА дикого типа.

Кроме антигенного шифта, который является эффективным инструментом в эволюции вирусов с сегментированным геномом, антигенный дрейф позволяет вирусам накапливать точечные мутации, тем самым избегать иммунного ответа и искать новые патогенные варианты. В нашем исследовании был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей российских штаммов дикого типа и вакцинных штаммов в области В- и Т-клеточных эпитопов.

Сравнительный анализ нейтрализующих антигенных эпитопов VP7. В области нейтрализующих эпитопов белка VP7 между российскими штаммами с генотипом G1 и штаммами в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix® показано 5 и 3 аминокислотных различий, соответственно (Рисунок 6). В сайтах антигенной нейтрализации было установлено по четыре аминокислотных различия соответствующих вакцинных штаммов в составе RotaTeq® и ротавирусами с генотипами G2, G3 и G4, изолированными на территории России. Сравнительный анализ аминокислотного состава в области сайтов антигенной нейтрализации отдельных компонентов вакцины RotaTeq® и штаммов РВА с генотипом G9, изолированных в России, показал наличие 14 различий с вакцинным штаммом G1 RotaTeq®, 19 с G2 штаммом и по 11 различий с компонентами VP7 генотипов G3 и G4. В регионах антигенной нейтрализации количество аминокислотных замен у современных российских штаммов ротавирусов и моновалентной вакцины Rotarix® различалось в зависимости от генотипа штамма и составило: G2 – 13 замен, G3 – 13 замен, G4 – 16 замен и G9 – 13 замен.

Для ротавирусов рассмотренных генотипов (G1, G2, G3, G4 и G9) установлены ключевые позиции аминокислот для связывания нейтрализующих антител [Aoki et al., 2009]. Для каждого генотипа циркулирующих на территории России ротавирусов выявлены замены в критических для связывания антител позициях (Рисунок 6).

Сравнительный анализ нейтрализующих антигенных эпитопов VP4. В области нейтрализующих эпитопов белка VP4 российские штаммы с генотипом P[8] отличаются от вакцинного штамма Rotarix® на четыре аминокислоты, от штамма в составе RotaTeq® на 6 аминокислот.

Ротавирусы дикого типа с генотипом P[4] отличаются от вакцинного штамма Rotarix® на 12 а.о., от вакцинного штамма в составе RotaTeq® на 10 а.о.

| Штамм | Антигенные эпитопы и их аминокислотные позиции | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 7-1a | | | | | | | | | | | | | 7-1b | | | | | | 7-2 | | | | | | | | | |
| | 87 | 91 | 94 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 104 | 123 | 125 | 129 | 130 | 291 | 201 | 211 | 212 | 213 | 238 | 242 | 143 | 145 | 146 | 147 | 148 | 190 | 217 | 221 | 264 |
| Rotarix G1 | T | T | N | G | E | W | K | D | Q | S | V | V | D | K | Q | N | V | D | N | T | K | D | Q | N | L | S | M | N | G |
| RotaTeq G1 | T | T | N | G | D | W | K | D | Q | S | V | V | D | K | Q | N | V | D | N | T | K | D | Q | S | L | S | M | N | G |
| RUS_G1-1 | . | . | S | . | E | . | ○ | ○ | . | N | . | . | . | ○ | . | . | ○ | ○ | ○ | . | . | . | . | N/○ | ○ | . | T | . | . |
| RUS_G1-2 | . | . | . | . | E | . | ○ | ○ | . | . | . | . | . | ○ | . | . | ○ | ○ | ○ | . | . | . | . | N/○ | ○ | . | . | . | . |
| | | | ● | | | | | | | ● | | | | | | | | | | | | | | | | | | ● | |
| | | | ▲ | | ▲ | | | | | ▲ | | | | | | | | | | | | | | | ▲ | | ▲ | | |
| RotaTeq G2 | A | N | S | D | E | W | E | N | Q | D | T | M | N | K | Q | D | V | S | N | S | R | D | N | T | S | D | I | S | G |
| RUS_IV-a1 | T | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RUS_IV-a3 | T | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | | ● | ● | ● | | | ● | ● | | ● | ● | ● | ● | | | ● | | | | | ● | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| | ▲ | | | ▲ | | | | | | | | | | | | | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | | |
| RotaTeq G3 | T | T | N | N | S | W | K | D | Q | D | A | V | D | K | Q | D | A | N | K | D | K | D | A | T | L | S | E | A | G |
| RUS_G3-3a | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T/○ | . | N/○ | N/○ | . | . | ○ | . | . | . | . | . | . |
| RUS_G3-3e | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T/○ | . | N/○ | N/○ | . | . | ○ | . | . | . | . | . | . |
| | ● | | | ● | ● | | | | | ● | ● | | | | ● | ● | ● | | | | ● | | ● | ● | | | ● | ● | |
| | ▲ | | | | | | | | | | | | | | | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | ▲ | | |
| RotaTeq G4 | S | T | S | T | E | W | K | D | Q | N | L | I | D | K | Q | D | T | A | D | T | R | A | S | G | E | S | T | S | G |
| RUS_G4 Ic | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | . | . | N | . | . | . | . | K | T | . | . | . | . | ○ | . | . |
| RUS_G4 II | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | V | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | ○ | . | . |
| | ● | | ● | ● | | | | | | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RUS_G9 | T | T | G | T | E | W | K | D | Q | D | A | I | D | K | Q | N | T | A | D | N | K | D | S | T/○ | L | S | E | S | G |
| Rotarix | | | ● | ● | | | | | | ● | ● | ● | | | | ● | ● | ● | | | ● | | ● | ● | | ● | ● | | |
| RotaTeq G1 | | | ▲ | ▲ | ▲ | | | | | ▲ | ▲ | ▲ | | | | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | | | ▲ | ▲ | | ▲ | ▲ | | |
| RotaTeq G2 | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | | ▲ | ▲ | | | ▲ | ▲ | ▲ | | | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | | ▲ | | ▲ | ▲ | | |
| RotaTeq G3 | | | ▲ | ▲ | ▲ | | | | | | | | ▲ | | | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | ▲ | | ▲ | | | | | ▲ | |
| RotaTeq G4 | ▲ | | ▲ | | | | | | | ▲ | ▲ | | | | | ▲ | | | | ▲ | ▲ | ▲ | | ▲ | ▲ | | ▲ | | |

Рисунок 6. Аминокислотные последовательности сайтов антигенной нейтрализации VP7 вакцинных штаммов Rotarix®, RotaTeq® и современных штаммов РВА, циркулирующих на территории России. Цифрами указан порядковый номер аминокислоты. (○) показаны единичные мутации, (▲) показано наличие аминокислотной замены в сравнении со штаммом RotaTeq®, (●) показано наличие замены в сравнении со штаммом Rotarix®. Розовым цветом выделены аминокислоты, ключевые для связывания антител (escape-mutations).

В-клеточные антигенные эпитопы белка VP6. В 2013 году Aiyegbo с соавторами было установлено, что двухкапсидная частица ротавириона может быть нейтрализована внутриклеточными антителами к белку VP6. В двух предполагаемых эпитопах обнаружены различия в позиции F248Y и L291S у штаммов I1 и I2 как вакцинных, так и штаммов дикого типа. В эпитопе А, образованному 30 аминокислотами, у российских штаммов первой геногруппы, была показана только одна замена V252I в сравнении с вакцинными штаммами, которая не коррелировала с субтиповой принадлежностью. В эпитопе В, образованном 28 аминокислотными остатками, у ряда российских штаммов I1 и I2 в позиции 281 установлена замена I281V, которая также не связана с филогенетической характеристикой штаммов.

Линейные эпитопы VP7, VP6 и NSP4. Клеточный иммунный ответ играет важную роль в контроле и элиминации вирусной инфекции. Единичные аминокислотные различия в Т-клеточных эпитопах могут привести к невозможности его распознавания специфическими Т-клонами.

По литературным данным, на белке VP7 установлено два Т-клеточных эпитопа: 16-28 а.о. и 40-52 а.о. [Honeyman et al., 2010; Wei et al., 2009]. Количество аминокислотных различий между российскими изолятами и пентавалентной вакциной RotaTeq® меньше, чем с моновалентной Rotarix®. Российские РВА с генотипом G1 в области линейных эпитопов отличались от вакцинных на 4 а.о. Вакцинный штамм Rotarix® отличался от российских РВА на: 14 а.о. (генотип G2), 6 а.о. (генотип G3), 15 а.о. (генотип G4), 13 а.о. (генотип G9). Штаммы в составе вакцины RotaTeq® отличались на 4 а.о. (генотип G2), 2 а.о. (генотип G3), 1 а.о. (генотип G4), 8-15 а.о. (генотип G9).

Т-клеточные эпитопы ранее были установлены в ряде работ [Wei et al., 2006; Parra et al., 2014; Zhao et al., 2008]. Анализ трех Т-клеточных эпитопов белка VP6 (341-349 а.о., 286-306 а.о., 301-315 а.о.) позволил установить аминокислотные различия между штаммами первой и второй геногруппы: N305A, Q315E, L342M, A348S. Все три эпитопа были высококонсервативны и не содержали точечных мутаций.

Анализ линейного эпитопа NSP4 (114-134 а.о. [Johansen et al., 1999]) у вакцинных и российских штаммов РВА показал наличие единичных мутаций у отдельных изолятов. Замена H131Y коррелировала с филогенетической принадлежностью линии E2-3. В позиции 133 ротавирусы первой геногруппы содержат аспарагин, второй геногруппы – лизин. Ротавирусы несущие NSP4

генотипа E3, ранее не описанного на территории России, в позиции 133 несут метионин (M) или валин (V).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе охарактеризовано генотиповое разнообразие ротавирусов, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2016-20 гг., определена субгенотиповая принадлежность доминирующих штаммов с генотипом G2P[4], установлена циркуляция двойных межгеногрупповых реассортантов и показано увеличение их доли в 2019-20 гг., дана филогеографическая характеристика штаммов ротавирусов с генотипами G2P[4] и G4P[8] на основе полногеномного анализа, свидетельствующая об их полифилетическом происхождении. На основе филодинамического анализа продемонстрирована долговременная стабильность и консервативность гена VP6 ротавирусов, изолированных на территории России. Установлено, что российские ротавирусы и штаммы в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix® несут разные аллели генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 и характеризуются наличием аминокислотных замен в области В- и Т-клеточных эпитопов белков VP7 и VP4 и их консервативностью у белков VP6 и NSP4.

ВЫВОДЫ

1. С использованием методики мультиплексной ПЦР дана характеристика генотипового разнообразия ротавирусов на территории Нижнего Новгорода в ранее не охарактеризованный период 2016-2020 гг. Установлена циркуляция РВА 14 G[P]-типов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8], G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6].

2. В период 2018-2019 гг. установлена активизация циркуляции штаммов с генотипом G2P[4]. Показано, что нижегородские штаммы G2P[4] несут убиквитарные аллели G2-IVa-1 и G2-IVa-3 гена VP7 и P[4]-IVa и P[4]-IVb гена VP4, родственные штаммам, изолированным на территории Нижнего Новгорода ранее.

3. Впервые показана циркуляция на территории России (Нижний Новгород) ротавирусов с генотипом G1P[8]-I2-E2, которые являются двойными межгрупповыми Wa- и DS-1 реассортантами. Установлено их родство со штаммами из Японии и Таиланда. В период 2019-20 гг. показано увеличение доли реассортантных штаммов до 12,7 %.

4. Методом высокопроизводительного секвенирования определен генотип всех сегментов генома двух штаммов РВА: G4-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-

N1-T1-E1-T1 и G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-T2. Дана их филогеографическая характеристика, установлено полифилетическое происхождение.

5. Показано, что российские ротавирусы и штаммы вакцин RotaTeq® и Rotarix® по генам VP7, VP4, VP6 и NSP4, кодирующих основные протективные антигены, относятся к разным филогенетическим линиям.

6. В структуре конформационных эпитопов VP4 и VP7 российских ротавирусов с генотипами G1, G2, G3, G4 и G9 и штаммов в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix® установлены аминокислотные замены, в том числе в критических для связывания антител сайтах. Показана консервативность в области линейных эпитопов вакцинных и нижегородских штаммов белка VP6 с генотипами I1 и I2, белка NSP4 с генотипами E1, E2, E3.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах перечня ВАК и баз данных WoS, Scopus и др.:

1. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines / **O.V. Morozova**, T.A. Sashina, S.G. Fomina, N.A. Novikova // Archives of Virology. – 2015. – V. 160(7). – P. 1693-703.

2. Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8]-штаммов ротавируса группы А / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 2. – С. 91-96.

3. Phylogenetic comparison of the VP7, VP4, VP6, and NSP4 genes of rotaviruses isolated from children in Nizhny Novgorod, Russia, 2015–2016, with cogent genes of the Rotarix and RotaTeq vaccine strains / **O.V. Morozova**, T.A. Sashina, N.V. Epifanova, V.V. Zverev, A.U. Kashnikov, N.A. Novikova // Virus Genes. – 2018. – V. 54(2). – P. 225-235.

4. Различия в аминокислотном составе антигенных эпитопов белка VP7 российских ротавирусов с генотипом G9 и вакцинных штаммов RotaTeq, Rotavac и Rotarix / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 57-66.

5. Phylodynamics of G4P[8] and G2P[4] strains of rotavirus A isolated in Russia in 2017 based on full-genome analyses / **O.V. Morozova**, A.E. Alekseeva, T.A. Sashina, N.F. Brusnigina, N.V. Epifanova, A.U. Kashnikov, V.V. Zverev, N.A. Novikova // Virus Genes. – 2020. – V. 56(5). – P. 537-545.

6. Филодинамическая характеристика российской популяции ротавируса А (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus) на основе гена VP6 / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65. - № 6. – С. 364-372

7. Increasing detection of rotavirus G2P[4] strains in Nizhny Novgorod, Russia, between 2016 and 2019 / **O.V. Morozova**, T.A. Sashina, N.V. Epifanova, A.U. Kashnikov, N.A. Novikova // Archives of Virology. - 2021. – V.166(1). – P. 115-124.

Тезисы:

1. Вариабельность нуклеотидной последовательности гена VP4 ротавирусов G1P[8] генотипа, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сборник трудов II Международной Интернет - конференции (Казань, 15-18 ноября 2011 г.) – Казань: «Казанский университет». – 2012. – Т. II. – С. 283-285.

2. Rotavirus A genotypes circulating in Nizhny Novgorod (Russian Federation) in 2005-2012 / **O.V. Morozova**, N.A. Novikova, N.V. Epifanova // 31th annual meeting of the European society for paediatric infection disease, Milan. – 2013. - P. 96.

3. Обнаружение у детей с острой кишечной инфекцией реассортантного варианта DS-1-подобных штаммов ротавируса G1P[8] генотипа / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, С.Г. Фомина, Н.А. Новикова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13. – № S1. – С. 232-233.

4. Обнаружение и молекулярная характеристика ротавирусов генотипа G12P[8] в Нижнем Новгороде / Т.А. Сашина, А.В. Леонов, Д.В. Созонов, **О.В. Морозова**, Н.В. Епифанова, А.Ю. Кашников, Н.А. Новикова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – 2018. – С. 194-195.

5. Активизация циркуляции штаммов ротавируса вида А с генотипом G2P[4] в Нижнем Новгороде в 2018-2019 гг. / **О.В. Морозова**, А.А. Новоселова, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // В сборнике: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2019. – С. 98-102.

6. Филогеография российских ротавирусов вида А генотипа G1 / **О.В. Морозова**, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. –2019. –С. 97-99.

7. Филогенетический анализ ротавирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде: характеристика разнообразия и сравнение с вакцинными штаммами / Т.А. Сашина, **О.В. Морозова**, А.В. Леонов, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10. - № S4-1. – С. 124.

8. Выявление реассортантных штаммов ротавируса А и определение их полного генотипа методом мультиплексной ПЦР / Т.А. Сашина, **О.В. Морозова**, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова // Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность». – 2020. – С. 210.