

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ I- И E- ГЕНОТИПОВ РОТАВИРУСА А С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Введение. В связи с разработкой и применением полногеномной системы классификации ротавирусов в последние годы в мире всё чаще отмечают присутствие реассортантных штаммов. Сведения о циркуляции таких штаммов на территории России недостаточны и фрагментарны. **Цель** настоящей работы – разработка методики определения генотипа сегментов, кодирующих белки VP6 (I-генотип) и NSP4 (E-генотип), позволяющей выявить реассортанты. **Материал и методы.** Ротавирус-положительные образцы изучали с помощью секвенирования и мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Филогенетический анализ штаммов проводили с применением Байесовского подхода. **Результаты.** На основе полученных нуклеотидных последовательностей нижегородских ротавирусов выявлены 3 аллеля гена VP6 (I1-1, I2-IV и I2-VII) и 7 аллелей гена NSP4 (E1-I, E1-III, E2-VI, E2-VII, E2-X, E2-XII и E3). С учётом результатов филогенетического анализа сконструированы олигонуклеотидные праймеры, специфичные в отношении генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3. Подобраны оптимальные условия для проведения мультиплексной ПЦР. Методика апробирована с использованием проб, содержащих ротавирусы, выявленные в Нижнем Новгороде в 2018 г. Определены спектр и долевое распределение I- и E-генотипов, а также их комбинации с G- и P-генотипами. **Обсуждение.** Доминировали ротавирусы с сочетанием G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), на 2-м месте были ротавирусы с констелляцией G2-P[4]-I2-E2 (29,1%). В единичных случаях были обнаружены штаммы с генотипами G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 и G2-P[4]-I2-E1, имеющие гены двух геногрупп ротавирусов, что позволяет отнести их к реассортантам. **Заключение.** Предложенный подход может послужить удобным инструментом для характеристики ротавирусов на этапе внедрения вакцинации населения против ротавирусной инфекции в России.

Ключевые слова: ротавирус А; генотип; праймеры; ПЦР; реассортантные штаммы; генотипирование; филогенетический анализ; аллели.

Для цитирования: Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Идентификация I- и E- генотипов ротавируса А с использованием мультиплексной ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 140-144.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144>

Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.

IDENTIFICATION OF ROTAVIRUS I- AND E-GENOTYPES BY MULTIPLEX PCR METHOD

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Introduction. In recent years the presence of reassortant rotavirus strains is increasingly mentioned in the world due to the application of the full-genome based classification system. Information on the circulation of such strains in the territory of Russia is limited. **The aim** of this work was the development of the approach for determination of genotypes of segments encoding VP6 (I) and NSP4 (E) to reveal reassortant strains. **Material and Methods.** Rotavirus-positive samples were studied by means of nucleotide sequencing and multiplex PCR. Phylogenetic analysis was conducted using the Bayesian approach. **Results.** Three alleles of the VP6 gene (I1-1, I2-IV, I2-VII) and seven alleles of the NSP4 gene (E1-I, E1-III, E2-VI, E2-VII, E2-X, E2-XII, E3) were detected on the base of nucleotide sequences of Nizhny Novgorod rotaviruses. Taking into account these results, the oligonucleotide primers specific to genotypes I1, I2, I3 and E1, E2, E3 were designed. Optimal conditions for multiplex PCR were chosen. The method was tested using the strains collected in Nizhny Novgorod in 2018. The diversity of I and E genotypes was determined and various combinations with G and P genotypes were identified. **Discussion.** G9-P[8]-I1-E1 rotaviruses were predominant (32.7 %) and G2-P[4]-I2-E2 rotaviruses were in second place (29.1 %). Strains with genotypes G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 and G2-P[4]-I2-E1 were detected sporadically. They had genes of two rotavirus genogroups, so can be considered to be reassortant. **Conclusion.** The proposed approach is a useful tool for the characterization of rotaviruses in the conditions of the beginning of vaccination against rotavirus infection in Russia.

Keywords: rotavirus A; genotype; primers; PCR; reassortant strains; genotyping; phylogenetic analysis; alleles.

For citation: Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Identification of rotavirus I- and E-genotypes by multiplex PCR method. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 140-144. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144>

For correspondence: Tatiana A. Sashina, Research Assistant, laboratory of molecular epidemiology of viral infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com

Information about authors:

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>Epifanova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Acknowledgments. Detection of rotavirus G- and P-genotypes was conducted in the framework of federal program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (No. 141-00063-18-00). Development of the PCR method for identification of rotavirus I- and E-genotypes was funded by RFBR, research project No. 18-34-00586.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 09 October 2018

Accepted 31 October 2018

Для корреспонденции: Сашина Татьяна Александровна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН НИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной, 603950, г. Нижний Новгород. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com

Введение

Ротавирус А (вид *Rotavirus A*, семейство *Reoviridae*) является возбудителем острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни во всём мире. В России в последние 10 лет показатель заболеваемости ротавирусной инфекцией возрос более чем в 8 раз (с 9,3 до 80,9 на 100 тыс. населения) [1]. Большое разнообразие генетических вариантов, способность к накоплению точечных мутаций и реассортация сегментов генома являются характерными чертами ротавируса А [2] и обуславливают необходимость постоянного мониторинга циркулирующих штаммов.

Для характеристики ротавирусов традиционно используют бинарную номенклатуру (G- и P-генотипы), основываясь на молекулярных свойствах 2 сегментов генома, кодирующих белки наружного капсида вириона (VP7 и VP4) [2]. Однако данная номенклатура не позволяет выявить и охарактеризовать реассортантные варианты ротавируса. Для преодоления этого ограничения была разработана полногеномная система классификации ротавирусов на основе свойств всех 11 сегментов генома [3]. В этой системе для сегментов, кодирующих белки VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, предложен акроним Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x – арабские цифры, обозначающие генотип). Генотипы VP7 и VP4 не отличаются от бинарной системы. Для каждого из оставшихся 9 сегментов, которые называют внутренними генами, выделено 8 генотипов или более [3, 4].

В ранних исследованиях было показано, что внутренние гены ротавирусов человека генотипов G1P[8], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] почти без исключений относятся к генотипу 1 и принадлежат первой или Wa-подобной геногруппе. Внутренние гены штаммов генотипа G2P[4], инфицирующих людей, как правило, относятся к генотипу 2 и принадлежат второй или DS-1-подобной геногруппе [4–7].

Однако в дальнейшем во многих странах были обнаружены межгеногрупповые реассортанты, имеющие смешанный набор генов 2 геногрупп. Например, начиная с 2011 г. в Японии, Таиланде и Вьетнаме были выявлены штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, имеющие гены белков наружного капсида 1-й геногруппы и внутренние гены 2-й геногруппы ротавирусов [8–13]. Также в качестве примера можно привести ротавирусы с генными конstellляциями G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 и G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, выявленные в Австралии, Испании, Японии, Таиланде, Венгрии и Вьетнаме [14–18].

Между тем в России на этапе внедрения вакцинации населения против ротавирусной инфекции знания о ротавирусах ограничиваются характеристикой с помощью бинарной системы классификации, информация о реассортантных штаммах фрагментарна, сведения о генотипах внутренних генов отсутствуют. В сезон 2013–2014 гг. на территории России (Нижний Новгород) были впервые выявлены реассортантные DS-1-подобные G1P[8]-штаммы ротавируса, родственные ранее обнаруженным в Японии и Таиланде. Секвенирование 4 генов (VP7, VP4, VP6 и NSP4) показало их принадлежность к генотипу G1-P[8]-I2-E2 [19]. Таким образом, дополнительный анализ генов, кодирующих белки VP6 (структурный элемент внутреннего капсида ротавириона) и NSP4 (ротавирусный энтеротоксин), может служить источником информации о реассортантном происхождении штамма. В связи с этим целью данной работы была

разработка методик для определения генотипов сегментов VP6 и NSP4 ротавирусов на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материал и методы

В работе использованы ротавирус-положительные образцы фекалий, полученные от 75 детей, госпитализированных с диагнозом «острая кишечная инфекция» (ОКИ) в инфекционный стационар Нижнего Новгорода. Ротавирусы выявляли с применением коммерческой ПЦР тест-системы АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Ропотребнадзора (далее – ЦНИИЭ), Россия). РНК ротавирусов выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Россия). Реакцию обратной транскрипции и ПЦР для определения генотипов вируса проводили с использованием реактивов производства ЗАО «Силекс» (Россия). Секвенирование кДНК открытых рамок считывания генов VP6 и NSP4 ротавирусов осуществляли по 2 цепям с применением набора реагентов Beckman Coulter GenomeLab™ DTCS-Quick Start Kit и прибора Beckman Coulter CEQTM 8000 (Beckman Coulter, США). I- и E-генотипы штаммов определяли с помощью онлайн-сервиса RotaC 2.0. Далее, в программе MEGA 6.0 анализировали полученные нуклеотидные последовательности и собирали выборки для построения деревьев [20]. Филогенетический анализ на основе 166 нуклеотидных последовательностей проводили с применением пакета программ BEAST 1.8 [21]. Использовали модель замещения нуклеотидов Хасегава–Кишино–Яно (Hasegawa–Kishino–Yano, HKY). Скорость эволюции моделировали на базе нестрогих логнормальных молекулярных часов. Для достижения значений ESS более 200 задавали длину цепи Маркова (MCMC) 50 млн шагов. На основе полученных данных в программе TreeAnnotator 1.8.2 строили филогенетические деревья и визуализировали их в программе FigTree 1.4.2. Идентификационные номера последовательностей в базе данных GenBank указаны в названиях изолятов на деревьях. Дизайн праймеров и анализ их свойств проводили в программах MEGA 6.0 и OligoAnalyzer [22]. Для подсчёта температуры плавления и моделирования возможных вторичных структур использовали значения $C_{\text{Oligo}} = 0,16$ мкМ, $C_{\text{Mg}^{2+}} = 3$ мМ, $C_{\text{dNTPs}} = 0,12$ мМ.

Результаты

Исследование разнообразия ротавирусов по генам VP6 и NSP4. На первом этапе было охарактеризовано разнообразие I- и E-генотипов в нижегородской популяции ротавирусов. Методом секвенирования генов VP6 и NSP4 при анализе выборки из 16 нижегородских ротавирусов, выявленных в 2016 г., определены два I-генотипа (I1 и I2) и три E-генотипа (E1, E2 и E3).

Был проведён филогенетический анализ для оценки разнообразия аллелей генов VP6 и NSP4 внутри генотипов. В выборки также вошли 36 нуклеотидных последовательностей штаммов из Нижнего Новгорода, установленные ранее [23–25] и 128 последовательностей генов VP6 и NSP4 ротавирусов, выявленных в 24 странах (Россия, Бельгия, Германия, Венгрия, Италия, США, Китай, Япония, Индия, Южная Корея, Таиланд, Бангладеш, Бразилия, Парагвай, ЮАР, Австралия, Демократическая Республика Конго, Тунис, Филиппины, Кения, Хорватия, Пакистан, Франция, Дания). Сокращённые филогенетические деревья представлены на рис. 1 (см. 3-ю полосу обложки).

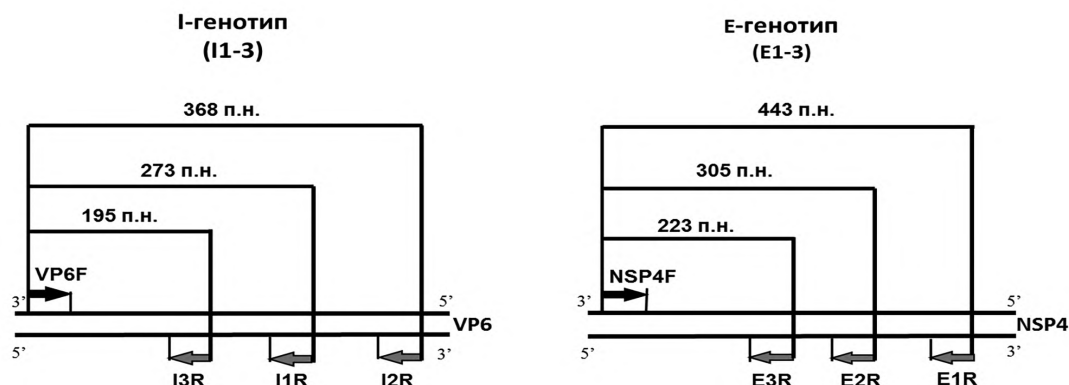


Рис. 2. Схема посадки праймеров для определения I- и E-генотипов на нуклеотидные последовательности генов *VP6* и *NSP4*.

У нижегородских ротавирусов выявлена вариабельность внутри генотипа I2, проявившаяся в принадлежности к 2 сублиниям (I2-IV и I2-VII), в то время как все штаммы ротавируса генотипа I1 относились к одной сублинии I1-1. Анализ гена *NSP4* показал наличие представителей 2 сублиний внутри генотипа E1 (E1-I и E1-III), 4 сублиний генотипа E2 (E2-VI, E2-VII, E2-X и E2-XII), в то время как все штаммы генотипа E3 принадлежали одному кластеру на филогенетическом дереве. Таким образом, было выявлено 3 аллеля гена *VP6* и 7 – гена *NSP4*.

Подбор олигонуклеотидных праймеров. С учётом данных секвенирования и филогенетического анализа были подобраны последовательности обратных праймеров, специфичных в отношении наиболее распространённых у ротавирусов человека генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3. В комбинации с концевыми прямыми праймерами, общими для всех генотипов сегмента, подобранные олигонуклеотиды фланкировали участки последовательности разной длины: 195 п.н. (I3), 273 п.н. (I1), 368 п.н. (I2) для гена *VP6* и 233 п.н. (E3), 305 п.н. (E2), 443 п.н. (E1) для гена *NSP4*, соответственно (рис. 2). Таким образом, полученные с помощью подобранных праймеров фрагменты кДНК могут быть идентифицированы методом электрофореза в агарозном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью.

С помощью программы OligoAnalyzer была теоретически рассчитана температура плавления праймеров и оценена их способность к образованию вторичных структур и димеров (см. таблицу). Далее, в ходе постановки серии пробных ПЦР с использованием ротавирус-содержащих проб были эмпирически скорректированы

условия постановки реакции. Параметры температуры отжига (T_a) подбирали в диапазоне 47–57 °С с шагом 2–3 °С. Кроме того, были подобраны необходимые концентрации ионов магния и праймеров в реакционной смеси. Оптимальными для определения I-генотипа были $T_a = 57$ °С, $C_{Oligo} = 130$ нМ, $C_{Mg^{2+}} = 2$ мМ. Для идентификации E-генотипа выбраны следующие условия: $T_a = 55$ °С, $C_{Oligo} = 130$ нМ, $C_{Mg^{2+}} = 2,5$ мМ.

Апробация разработанных методик. Экспериментально подобранные условия проведения ПЦР и специфичность разработанных праймеров были проверены с использованием проб, содержащих РНК ротавирусов разных E- и I-генотипов, ранее исследованных методом секвенирования. Выборка образцов включала 9 изолятов генотипа I1, 7 изолятов генотипа I2, 7 изолятов генотипа E1, 5 изолятов генотипа E2 и 2 изолята генотипа E3. Результаты генотипирования предложенными ПЦР-методиками полностью соответствовали данным секвенирования. Таким образом, данные методики могут быть использованы для рутинного определения E- и I-генотипа в ротавирус-положительных образцах.

Разработанные методики были апробированы на 55 образцах кДНК ротавирусов, выявленных в 2018 г. (рис. 3). I- и E-генотипы были установлены в 51 (92,7%) образце. В 1 (1,8%) пробе был определён только E-генотип, в 3 (5,5%) – только I-генотип. В большинстве случаев генотипы были выявлены в сочетании I1-E1 (52,7%). Комбинация I2-E2 обнаружена в 30,9% случаев. Кроме того, в 3 (5,5%) пробах идентифицирован генотип I1-E2, и в единичных случаях показаны генотипы I2-E1 и I3-E3 (в сумме 3,6%). Установлены следующие сочетания G-, P-, I-, и E-генотипов: G1-P[8]-I1-E1 (9,1%), G4-P[8]-I1-E1 (7,3%), G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), G4-P[8]-I1-E2 (5,5%), G3-P[8]-I2-E2 (1,8%), G2-P[4]-I2-E2 (29,1%), G2-P[4]-I2-E1 (1,8%), G2-P[4]-I2-Eх (3,6%), G9-P[8]-I1-Eх (1,8%), Gх-P[8]-I1-E1 (5,5%) и Gх-P[х]-I3-E3 (1,8%).

Обсуждение

В настоящее время показано, что реассортантные варианты ротавируса имеют более широкое распространение в мире, чем предполагали ранее. Так, в Японии в 2012 г. штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-N2 составили 46,7% изолятов, собранных в 3 городах [9]. Кроме того, в 2012–2013 гг. эти штаммы вызвали 12 вспышек острой кишечной инфекции (ОКИ) в детских до-

Последовательность праймеров для определения I- и E-генотипов ротавирусов

Праймер	Последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, н.о.	Регион посадки, н.о.	T_m средняя, °С
NSP4F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTC	–	1–21	58,2
E1R	CAGGTTGTCAATGATACG	443	443–426	54,8
E2R	YTGUTCTTTRTAACSTGC	305	305–288	55,4
E3R	GACGTTCTAAGAGCAATC	223	223–206	55,1
VP6F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	–	1–21	58,2
I1R	AGTTCTKGCAGTCTCAAC	272	272–255	58,1
I2R	GARTCTGATGTGGTGC	367	367–361	56,3
I3R	TCTGACGGGTAGRTTA	194	194–179	53,9

школьных учреждениях [10]. Родственные им ротавирусы были обнаружены в Таиланде в 2013 г. [11]. Во Вьетнаме штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 составили 14% всех ротавирус-положительных образцов и, по предположению авторов, возникли независимо от японских ротавирусов [13]. В качестве нового пандемического варианта рассматриваются штаммы G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, родственные ротавирусам лошадей и обнаруженные на территории Европы, Азии и Австралии [16]. Во Вьетнаме в первой половине 2015 г. молниеносно возник генотип G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, составив 27% всех исследованных ротавирусов [18].

Выявление реассортантов с использованием только бинарной классификации не представляется возможным. В связи с её широким использованием в России реальный вклад таких штаммов может быть недооценён. Например, в Нижнем Новгороде в 2013–2014 гг. были обнаружены и охарактеризованы методом секвенирования реассортантные DS-1-подобные G1P[8]-штаммы ротавируса генотипа G1-P[8]-I2-E2 [19]. Однако осталась неясна их истинная доля среди ротавирусов генотипа G1P[8] в нижегородской популяции, а также не решён вопрос о том, являются ли такие штаммы уникальными для Нижегородской области или они представлены и в других регионах России.

Эти вопросы могут частично решить представленные методики, которые подходят для быстрого определения E- и I-генотипов ротавирусов. С использованием прямых праймеров, общих для всех генотипов сегмента, и обратных праймеров, специфичных в отношении генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3, могут быть амплифицированы фрагменты нуклеотидных последовательностей генов VP6 и NSP4 разных длин, заданных для каждого E- и I-генотипа. Данные методики были проверены на выборке образцов, ранее охарактеризованных методом секвенирования, и апробированы на ротавирус-содержащих пробах 2018 г.

Оба изучаемых генотипа были установлены в 92,8% образцов, при этом доминирующей комбинацией была I1-E1 (52,7%). В 30,9% случаев показано сочетание I2-E2, также обнаружены генотипы I1-E2, I2-E1 и I3-E3 (в сумме 9,2%). При анализе их соответствия G- и P-генотипам в 49,1% случаев были обнаружены констелляции, характерные для Wa-подобной группы (G1-P[8]-I1-E1, G4-P[8]-I1-E1 и G9-P[8]-I1-E1) и в 29,1% случаев – для DS-1-подобной геногруппы (G2-P[4]-I2-E2). В единичных случаях обнаружены штаммы генотипов G4-P[8]-I1-E2 (5,5%), G3-P[8]-I2-E2 (1,8%) и G2-P[4]-I2-E1 (1,8%), имеющие гены 2 геногрупп и, таким образом, являющиеся реассортантами. Возможно, штаммы генотипа G3-P[8]-I2-E2 родственны варианту, широко распространённому в мире и охарактеризованному R. Dogo и соавт. [16], поэтому необходимо дальнейшее изучение особенностей других сегментов их генома.

Следует отметить, что в 2018 г. не были обнаружены реассортантные штаммы генотипа G1-P[8]-I2-E2, которые присутствовали в нижегородской популяции ранее. Также особенностью данного периода является высокая доля ротавирусов генотипа G2P[4]-I2-E2 (29,1%), представителей DS-1-подобной геногруппы. В предыдущие годы доля ротавирусов данного генотипа не превышала 10% на фоне доминирования в Нижнем Новгороде генотипа G9P[8] [26, 27]. В некоторых регионах России ранее также был отмечен низкий долевым вклад ротавирусов генотипа G2P[4]: в Москве в 2009–2014 гг. – 3,3%

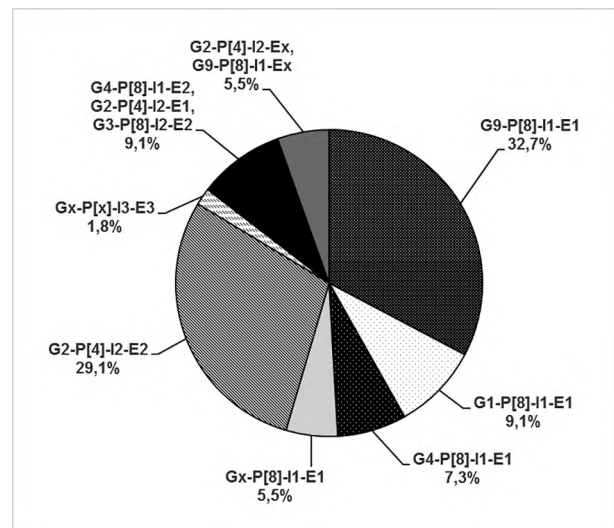


Рис. 3. Распределение комбинаций G-, P-, I-, и E-генотипов ротавирусов в Нижнем Новгороде в 2018 г.

[28], в Оренбургской области в 2015–2016 гг. – 11,1% [29], по Российской Федерации в целом в 2012–2013 гг. – 7,9% [30]. В условиях активной циркуляции DS-1-подобных ротавирусов возможно повышение числа событий межгеногрупповой реассортации и появление необычных штаммов. Предложенные в настоящей работе подходы для определения E- и I-генотипов ротавирусов могут послужить удобным инструментом для их характеристики.

Заключение

Таким образом, были разработаны и апробированы новые методики определения генотипов сегментов, кодирующих белки VP6 и NSP4, которые могут быть использованы для рутинного исследования ротавирус-положительных образцов и выявления реассортантных штаммов. Определены спектр и доленое распределение I- и E-генотипов, выявлены их различные комбинации с G- и P-генотипами. В Нижнем Новгороде в 2018 г. доминировали ротавирусы генотипа G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), следующим по распространённости был генотип G2-P[4]-I2-E2 (29,1%). Обнаружены реассортантные штаммы с генотипами G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 и G2-P[4]-I2-E1.

Финансирование. Определение G- и P-генотипов ротавирусов проведено в рамках государственного задания Роспотребнадзора (№ 141-00063-18-00), разработка методики идентификации I- и E-генотипов ротавирусов выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00586.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-18, 20-22, 26-28, 30 см. REFERENCES)

- Черепанова Е.А., Симонова Е.Г., Раичич Р.Р., Линок А.В., Филатов Н.Н. Оценка эпидемиологического риска в системе надзора за актуальными для Российской Федерации острыми кишечными инфекциями. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018; (3): 23-8.
- Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8]-штаммов ротавируса группы А. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 91-6.

23. Новикова Н.А., Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Прилипов А.Г., Епифанова Н.В., Голицына Л.Н. Анализ нуклеотидных последовательностей гена NSP4 ротавирусов группы А, изолированных в Нижнем Новгороде. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(6): 35-9.
24. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011-12 годах. *Медицинский алфавит*. 2013; 4(24): 20-6.
25. Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А., Морозова О.В., Фомина С.Г., Луконникова Л.Б. и др. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005-2012 годах. Доминирование генотипа G4P[8]. *Медицинский альманах*. 2014; (2): 52-7.
29. Денисюк Н.Б., Паньков А.С. Генетическая структура ротавирусной группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в эпидемический сезон 2013-2014 гг. *Инфекционные болезни*. 2016; 14(1): 14-8.

REFERENCES

1. Cherepanova E.A., Simonova E.G., Raichich R.R., Linok A.V., Filatov N.N. Assessment of epidemiological risk in the system of surveillance for acute intestinal infections relevant to the Russian Federation. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2018; (3): 23-8. (in Russian)
2. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347-401.
3. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
4. Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijis I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204-19. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
5. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 2008; 82(22): 11106-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-08>
6. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S., et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000634. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>
7. Jere K.C., Mlera L., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Page N.A., Seheri M.L., et al. Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing. *J. Med. Virol.* 2011; 83(11): 2018-42. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.22207>
8. Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Kida K., Mizoguchi Y., Kanadani T., et al. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J. Med. Virol.* 2014; 86(6): 1056-64. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.23746>
9. Fujii Y., Nakagomi T., Nishimura N., Noguchi A., Miura S., Ito H., et al. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 426-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.001>
10. Yamamoto S.P., Kaida A., Kubo H., Iritani N. Gastroenteritis Outbreaks Caused by a DS-1-like G1P[8] Rotavirus Strain, Japan, 2012-2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(6): 1030-3. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2006.131326>
11. Komoto S., Tacharoengmuang R., Guntapong R., Ide T., Haga K., Katayama K., et al. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141739. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141739>
12. Phan M.V.T., Anh P.H., Cuong N.V., Munnink B.B.O., van der Hoek L., My P.T., et al. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus Evol.* 2016; 2(2): vew027. Doi: <https://doi.org/10.1093/ve/vew027>
13. Nakagomi T., Nguyen M.Q., Gauchan P., Agbembabiese C.A., Kaneko M., Do L.P., et al. Evolution of DS-1-like G1P[8] double-gene reassortant rotavirus A strains causing gastroenteritis in children in Vietnam in 2012/2013. *Arch. Virol.* 2017; 162(3): 739-48. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3155-6>
14. Arana A., Montes M., Jere K.C., Alkorta M., Iturriza-Gómara M., Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44: 137-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.048>
15. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403-10. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>
16. Dóro R., Marton S., Bartókné A.H., Lengyel G., Agócs Z., Jakab F., et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2016; 63(2): 243-55. Doi: <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.2.8>
17. Hoa-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Do L.P., Gauchan P., Agbembabiese C.A., et al. Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 479-82. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2682-x>
18. Tacharoengmuang R., Komoto S., Guntapong R., Ide T., Sinchai P., Upachai S., et al. Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains. *PLoS One*. 2016; 11(11): e0165826. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165826>
19. Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P [8] strains of rotavirus A. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(1): 91-6. (in Russian)
20. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
21. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 2012; 29(8): 1969-73. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
22. IDT's Oligo Analyzer Version 3.1. Available at: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
23. Novikova N.A., Ponomareva N.V., Novikov D.V., Prilipov A.G., Epifanova N.V., Golitsyna L.N. Nucleotide sequence analysis of the NSP4 gene from group A rotaviruses isolated in Nizhny Novgorod. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(6): 35-9. (in Russian)
24. Epifanova N.V., Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Characteristics of rotavirus with G9-genotype identified in Nizhny Novgorod during years 2011-12. *Meditsinskiy alfavit*. 2013; 4(24): 20-6. (in Russian)
25. Epifanova N.V., Sashina T.A., Novikova N.A., Morozova O.V., Fomina S.G., Lukonnikova L.B., et al. The variety of genotypes of rotaviruses in Nizhny Novgorod in 2005-2012. The domination of G4P[8] genotype. *Meditsinskiy al' manakh*. 2014; (2): 52-7. (in Russian)
26. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Zverev V.V., Kashnikov A.U., Novikova N.A. 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 RotaTaq vaccine strains. *Virus Genes*. 2018; 54(2): 225-35. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1529-9>
27. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387-92.
28. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-Genetic Characterization of Human Rotavirus A Strains Circulating in Moscow, Russia (2009-2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304-13. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
29. Denisjuk N.B., Pan'kov A.S. The genetic structure of group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in the 2013-2014 epidemic season. *Infektsionnye bolezni*. 2016; 14(1): 14-8. (in Russian)
30. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5: 407-13. Doi: <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.5.7055>

Поступила 09.10.18

Принята в печать 31.10.18

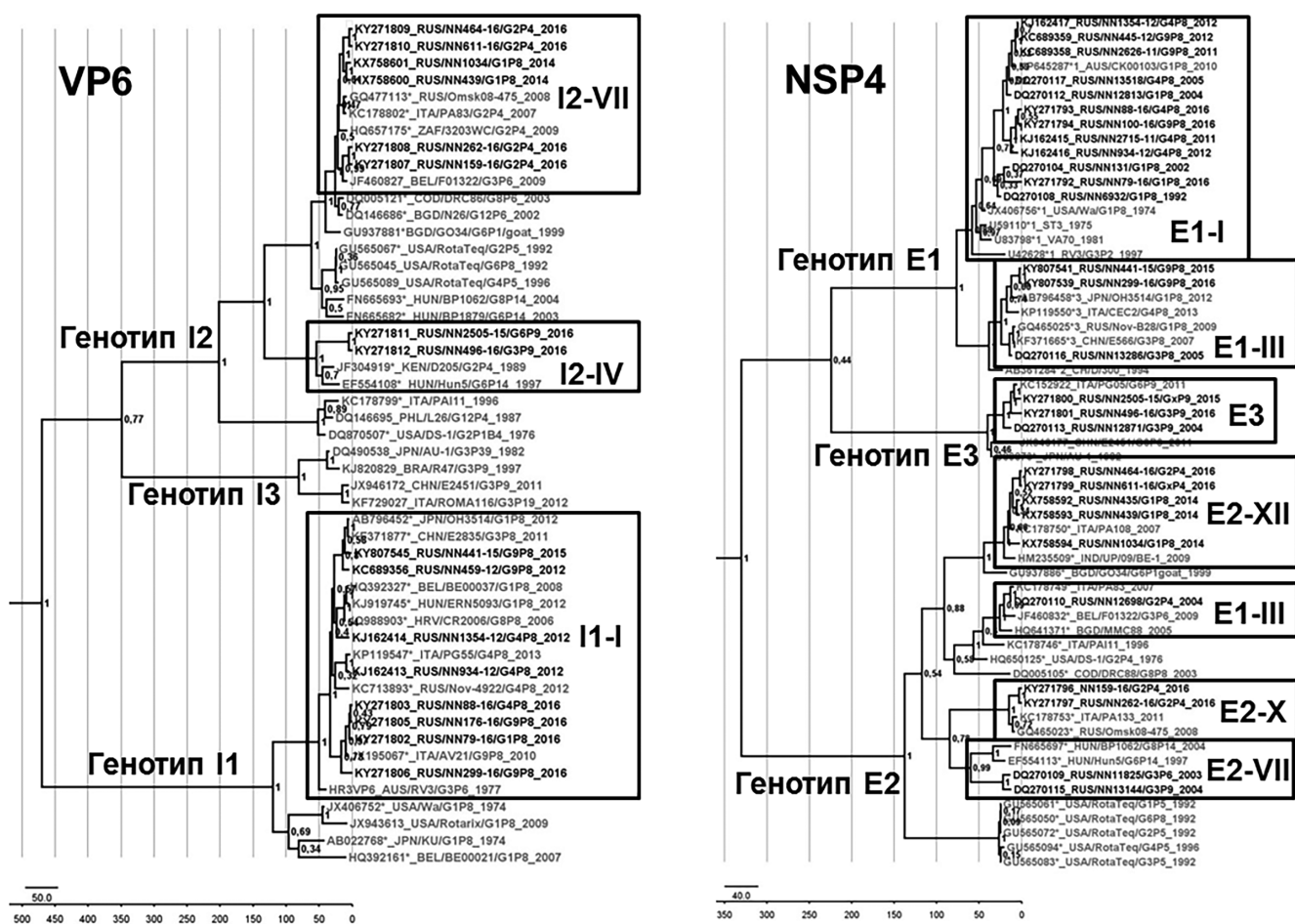


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные на основе генов *VP6* и *NSP4* ротавирусов.

Штаммы из Нижнего Новгорода отмечены чёрным, из других стран – серым. Прямоугольниками обозначены кластеры, в состав которых входят нижегородские ротавирусы. Идентификационные номера GenBank указаны в названии штаммов. В узлах деревьев отмечены значения апостериорной вероятности.