

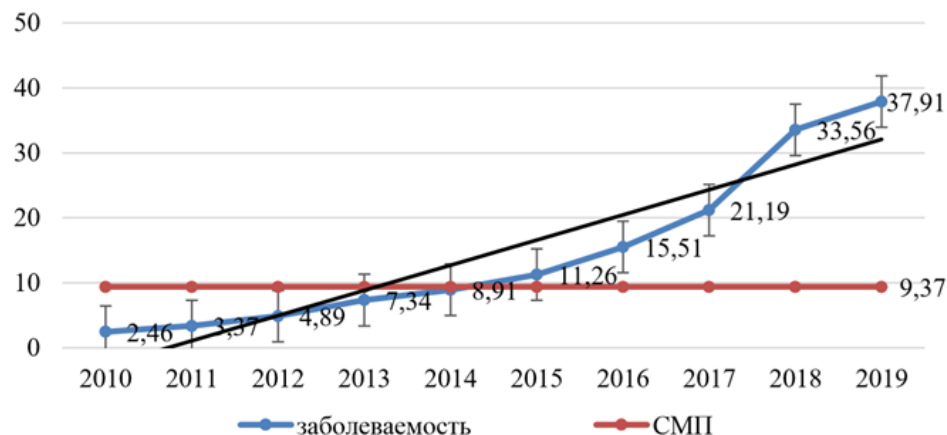
**Нижегородский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,
Нижний Новгород, Россия**

**Лаборатория молекулярной эпидемиологии
вирусных инфекций**

**Генотиповая структура популяций норовирусов:
активизация циркуляции новых рекомбинантов**

к.б.н. Епифанова Н.В., д.б.н. Новикова Н.А.

Заболеваемость норовирусной инфекцией (НВИ) в Российской Федерации



Динамика заболеваемости норовирусной инфекцией в Российской Федерации, 2010–2019 гг. (показатель на 100 тыс. населения)

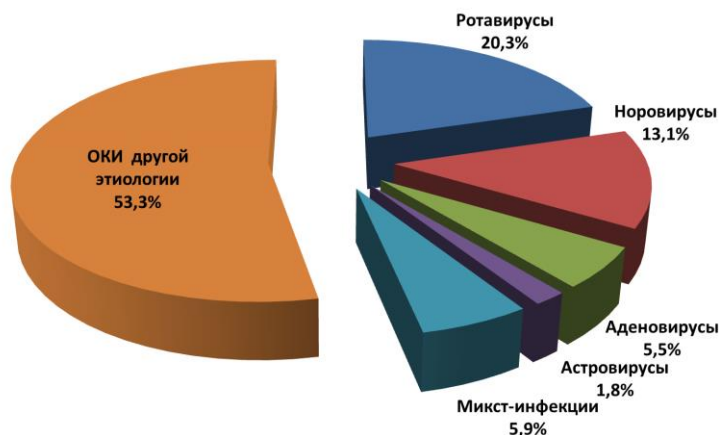
- В России в 2019 году показатель заболеваемости НВИ (37,91 на 100 тыс. населения) превысил таковой в 2018 г. на 13 %, среднемноголетний за предыдущий 10 летний период (9,37) – в 4 раза.
- В 2019 году было зарегистрировано 215 очагов групповой заболеваемости НВИ с общим количеством пострадавших 2705 человек.

[Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году»] https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933

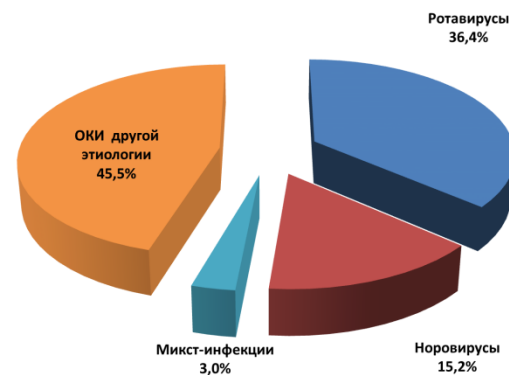
Молекулярно-генетические исследования норовирусов являются в настоящее время неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за острыми кишечными инфекциями (ОКИ), актуальность которого обусловлена ведущей роль норовирусов в этиологической структуре вспышек и групповых заболеваний ОКИ во всех возрастных группах, и второе после ротавирусов место при спорадической заболеваемости. В тех странах, где введена вакцинация против ротавирусной инфекции, норовирусы устойчиво вышли на первое место. По информации Госдоклада Роспотребнадзора в 2019 г. на территории Российской Федерации наиболее распространенной среди ОКИ являлась норовирусная инфекция (НВИ).

Выявление кишечных вирусов при спорадической заболеваемости ОКИ на территории Нижнего Новгорода, июль 2019 – июнь 2020 гг.

Все госпитализированные, n=1381



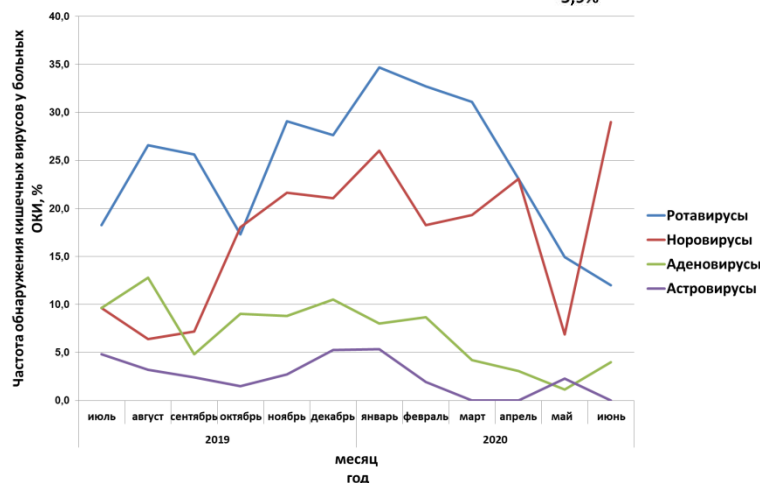
Пациенты ОРИТ, n=66



Обследовано 1381 больных, госпитализированных в отделение кишечных инфекций детского инфекционного стационара

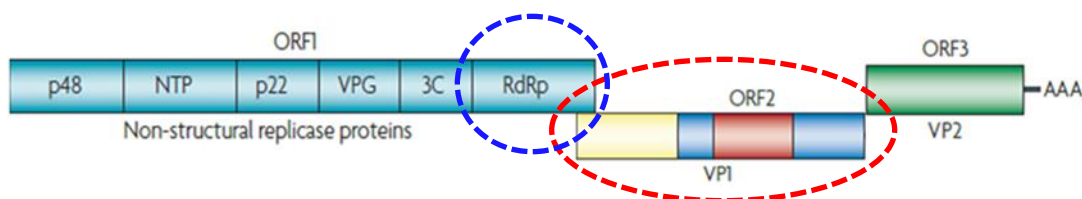
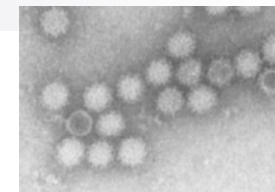
Из них 66 человек получали медицинскую помощь в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ)

Норовирусы обнаружены в 244 случаях (17,7% с учетом микст-инфекций)



По нашим данным, полученным за эпидсезон 2019-2020 гг. при этиологической расшифровке 1381 случая ОКИ у больных, госпитализированных в один из инфекционных стационаров Нижнего Новгорода, норовирусы были выявлены в моноинфекции у 13,1% пациентов, с учетом микст-инфекций - у 17,7%. Причиной 15,2% из 66 тяжелых случаев ОКИ за этот период явились норовирусы.

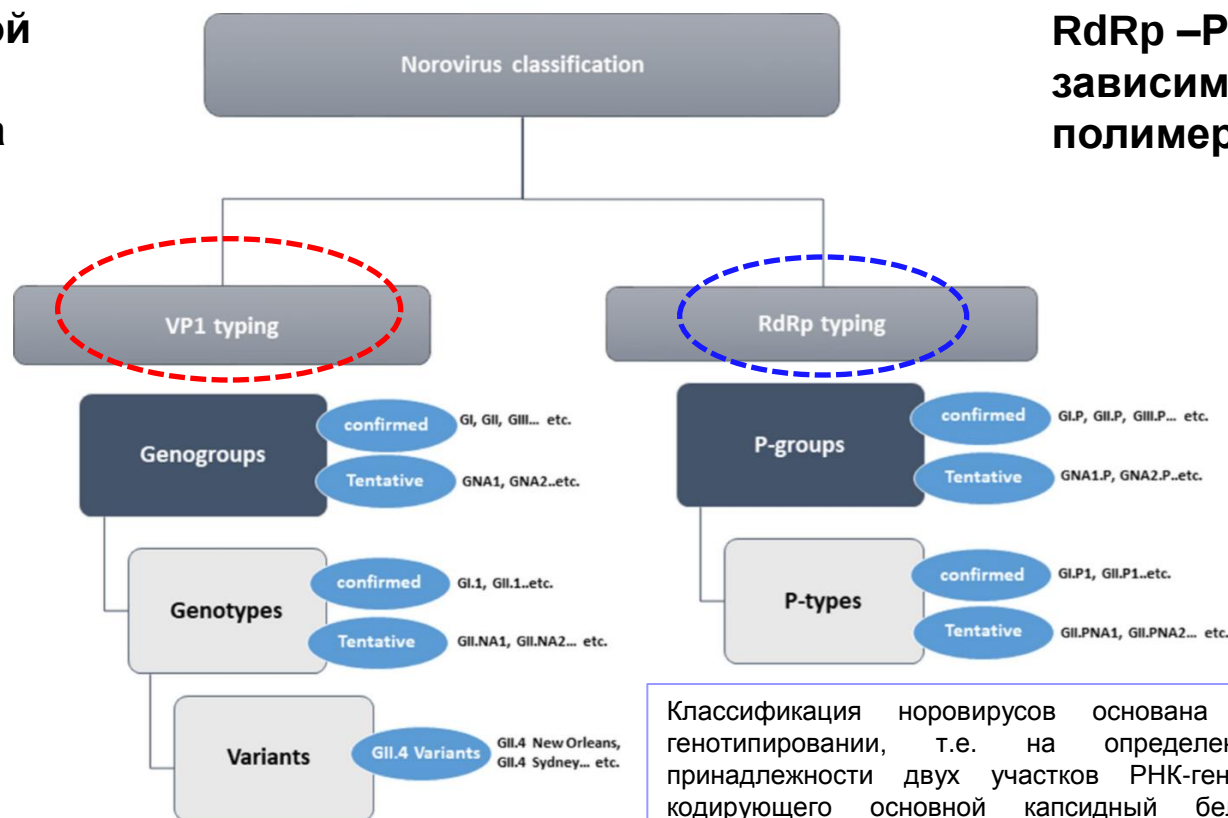
Двойное генотипирование норовирусов



Структура генома норовирусов

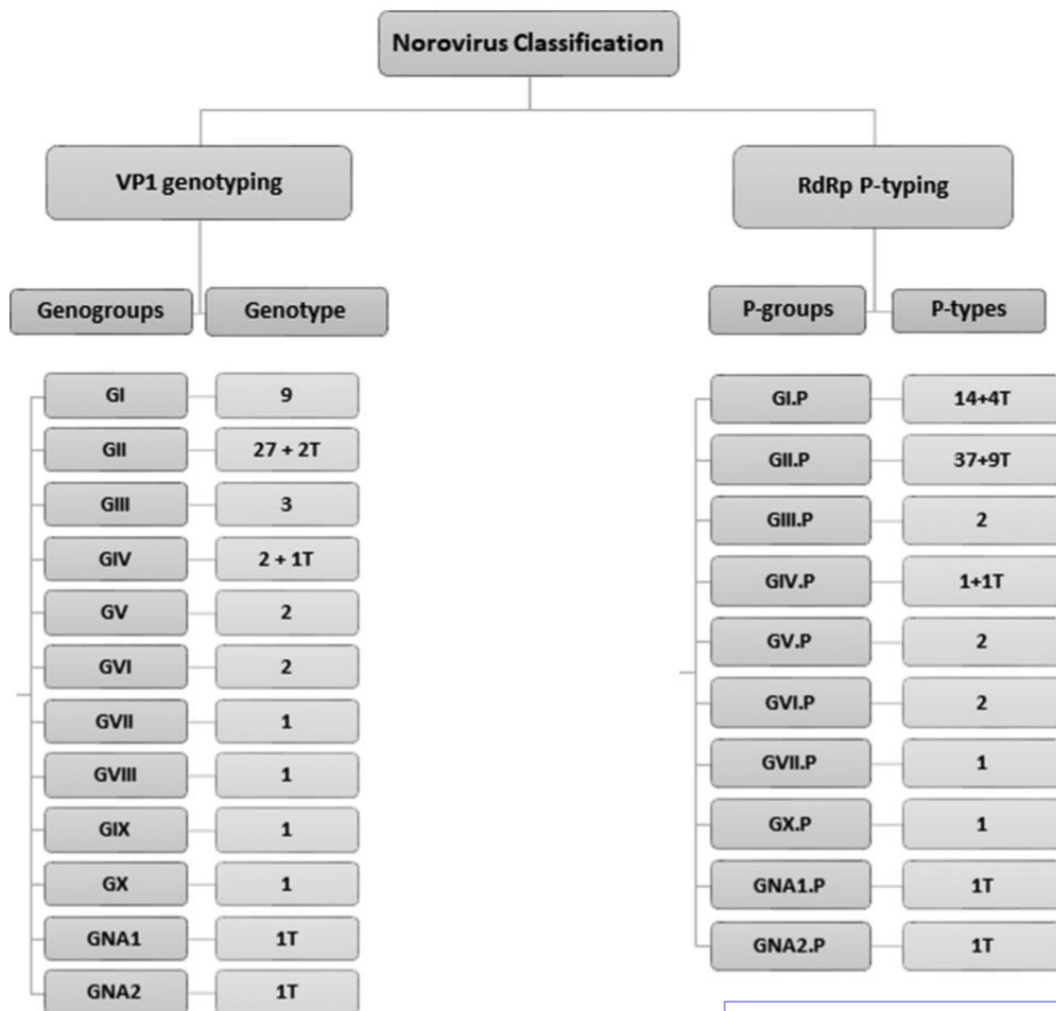
VP1 – основной структурный белок капсида

RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза (P)



Классификация норовирусов основана на двойном генотипировании, т.е. на определении типовой принадлежности двух участков РНК-генома: участка, кодирующего основной капсидный белок – VP1-типирование, которое позволяет выделить геногруппы, генотипы и варианты норовирусов, и участка, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу – Р-типирование, в результате которого дифференцируют Р-группы и Р-типы.

Новая классификация норовирусов



Новые обозначения генотипов норовирусов

Прежнее	Новое
GI.P6-GI.6	GI.6[P6]
GI.Pd-GI.3	GI.3[P13]
GII.P1-GII.1	GII.1[P1]
GII.P12-GII.3	GII.3[P12]
GII.Pe-GII.4	GII.4 Sydney[P31]
GII.P16-GII.4 Sydney	GII.4 Sydney[P16]
GII.P4 New Orleans-GII.4 Sydney	GII.4 Sydney[P4 New Orleans]
GII.Pe-GII.17	GII.17[P31]
GII.P15-GII.15	GIX.1[GII.P15]
GVI.P1-GIV.2	GIV.2[GVI.P1]

[Chhabra et al., Journal of General Virology, 2019]

В конце 2019 г. группой исследователей, работающих в международном проекте NoroNet, была предложена обновленная классификация норовирусов, включающая в настоящее время 10 геногрупп и 49 генотипов, 8 Р-групп и 60 Р-типов. В каждой категории есть кандидаты на новые группы и типы, которые пока не утверждены из-за наличия единичных нуклеотидных последовательностей.

Методология генотипирования норовирусов



Схема структурной организации генома норовирусов. Серым цветом выделены области, используемые для генотипирования

Norovirus Typing Tool Version 2.0

This tool is designed to use phylogenetic methods in order to identify the Norovirus genotype of a nucleotide sequence.
Note for batch analysis: The genotypetool accepts up to 20000 sequences at a time.

You may either:

- A. Paste one or more sequences in FASTA format in the input field.
- B. Upload a FASTA file.
- C. Upload FASTQ files.
- D. Revisit results of a previous run

A) Paste nucleotide sequence(s) in FASTA format:

```
>3471
TGGACTAGAGGACCAATCATGAAGCCCTAATGAGACAATGATACCCATTCCCAAGACCCATACAGCTCATGGCACTGCT
TGGTGAAGCCTCTTTCACGGACCCCTTTCTACAGTAAATCAGTAAATGGTCATACTGAACCTCAAGAGAGGTGGATGG
ACTTTTACGTGCCAAGGACCAATCATGTTTTCAGTGGATGAGGTTTCTGACTTGAGCAGCTGGGAGGCGATCGCAATCTG
GCTCCCAATTTTGTGAATGAAGATGGCGTGCAGTGACGCCAACCCTCTGATGGGTCCGACGCCACCTCTGACAGAGGTCA
ACAAATGAGGTTATGGCTTGAGCCCGCTTTGGTGGCCTATTGCGACCTGTACGGGCGACCAAAATGATTAATGACCC
TGGATTAGAAATATTTTGTCAAGCCCTTGGTGGGAGTTTACAGTATCCCCAGAAACGCTCCAGGTGAATATCTATGAGS
CGCGCCCTAGGCCCTGACCTAAATCCCTACCTATCCCATTTGGCCAGAATGTACAATGTTATGTCAGGTGG
>672
TGGCAAGAGGACCAACCATGAAGCCCACTGAGACCATGATACCCAGCAGCAAGACCTGTGACGCTCATGGCACTACT
AGGAGATCTCTCCCTACATGGACCTCATTTTACGCAAGGTTAGCAAAATGATCATATCTGAACCTTAAAGAGGAGGATGG
ATTTTATGTGCCACAGCAAGGTCAATGTTTCAATGATGAGGTTCTCAATCTAAGCAATGAGGAGGCGATCGCAATCTG
GCTCCCAATTTTGTGAATGAAGATGGCGTGCAGTGACGCCAACCCTCTGATGGGTCCGACGCCACCTCTGACAGAGGTCA
ACAAAGAGGACCTTCCCTAGAACCACTTGGCGGCGCAGCTATAGCCGCCACCGTCACTGGGCGCAAAATATATAATTGACCC
TGGATTAGCAAAATTTTGTCAAGCAGCAAAATGAGAGTTTCAAGTGTCAACCGAAGACTCTCTGGGAGAAATTTTATGAA
CTTAGAGTTGGGCGCTGACTTGAACCCCTAATTTGGCTCATTTGTCAAGGATGTACAATGGGTATGCTGGTGG
```

Start Clear

Внешний вид главного рабочего окна сервиса
Norovirus Typing Tool Version 2.0

4.4. Общие вопросы по методам контроля

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Методические рекомендации
МР 4.4. - 20

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием		Размер продукта
название	Последовательность (5'-3')	для реакционного объема 25 мкл	Температура	Время		Температура	Время	
MON431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	20 нм/мкл	95°C	15мин		95°C	15мин	570 п.н.о.
			95°C	80с		95°C	15с	
			50°C	80с	40 циклов	50°C	15с	
G2SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR CAT	20 нм/мкл	72°C	80с		72°C	15с	
			72°C	2мин		72°C	2мин	
			4°C	(хранение)		4°C	(хранение)	

Методика для амплификации участка генома норовирусов II геногруппы
Область генов полимеразы и капсидного белка VP1



Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (2018740672) later.

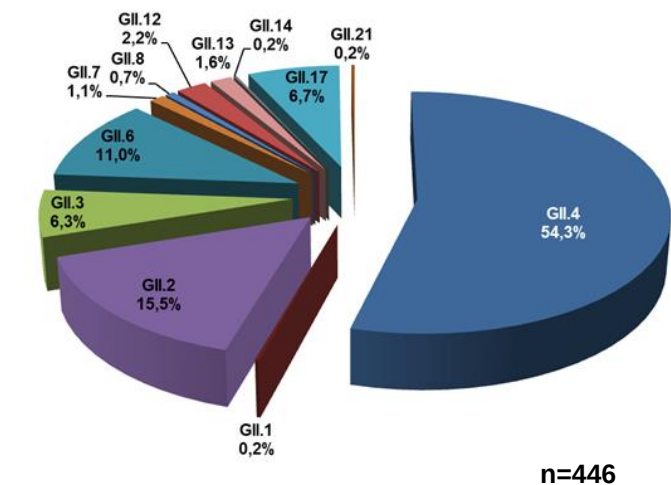
Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	ORF1	ORF2	Report	genome
3471	570	Caliciviridae Norovirus GII	89.29825	GII.P16	GII.4	Report	
672	570	Caliciviridae Norovirus GII	85.96491	GII.P17	GII.17	Report	

Внешний вид окна результатов анализа нуклеотидных последовательностей сервиса
Norovirus Typing Tool Version 2.0

<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool> – адрес сайта онлайн сервиса для автоматического генотипирования норовирусов, проект NoroNet (в свободном доступе)

Методология генотипирования норовирусов изложена, в частности, в разработанных нами в сотрудничестве с коллегами из ЦНИИЭ методических рекомендациях, которые находятся на рассмотрении в Роспотребнадзоре. Она основана на амплификации области соединения генов полимеразы и структурного белка капсида VP1, секвенировании полученного фрагмента и анализе нуклеотидной последовательности с помощью онлайн-системы автоматического типирования норовирусов, доступной на сайте проекта NoroNet. В итоге осуществляется двойное типирование при исследовании одного фрагмента генома, позволяющее выявить, в том числе и рекомбинанты.

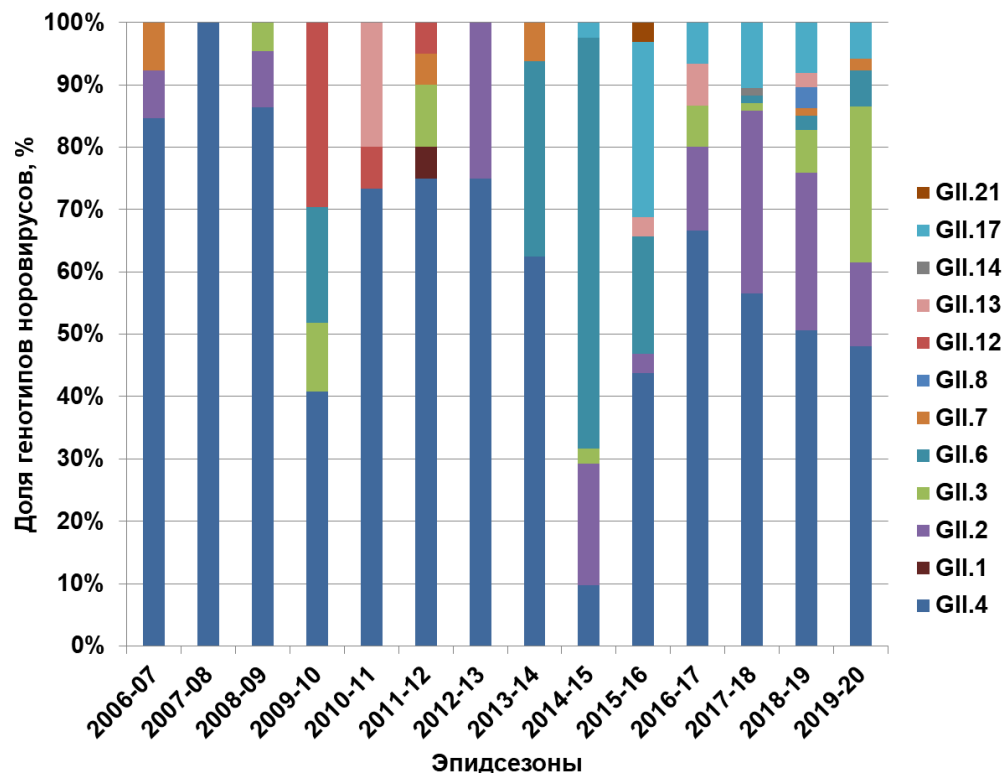
Генотипы норовирусов, циркулировавших на территории г. Нижнего Новгорода в 2006-2020 гг.



Рекомбинанты:

GII.2[P16]
 GII.2[P21]
 GII.3[P12]
 GII.3[P21]
 GII.4 Sydney[P4 NewOrleans]
 GII.4 Sydney [P16]
 GII.4 Sydney[P31]

GII.6[P7]
 GII.12[P33]
 GII.13[P16]
 GII.14[P7]
 GII.13[P21]

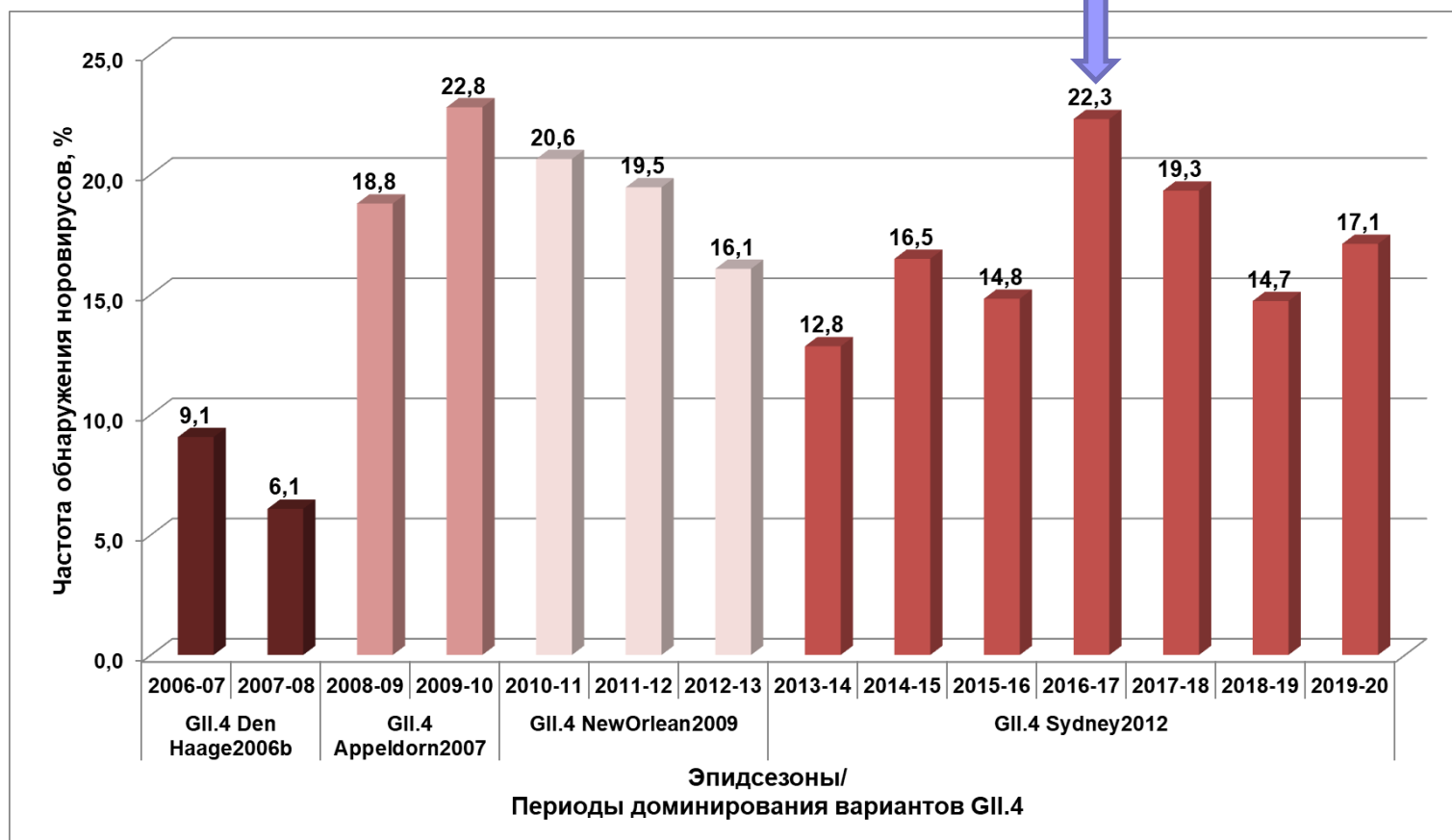


В последнее время мы успешно пользуемся этой методикой. На слайде представлен спектр генотипов норовирусов и динамика их циркуляции на территории Нижнего Новгорода в ретроспективе за весь период наших наблюдений с 2006-го по 2020 г., который включает двенадцать генотипов с преобладанием в целом, как и во всем мире в последние два десятилетия, генотипа GII.4. Типирование по двум участкам генома позволило выявить целый ряд рекомбинантов.

Увеличение частоты выявления норовирусов при появлении новых рекомбинантов

Нижний Новгород 2006-2020 гг.

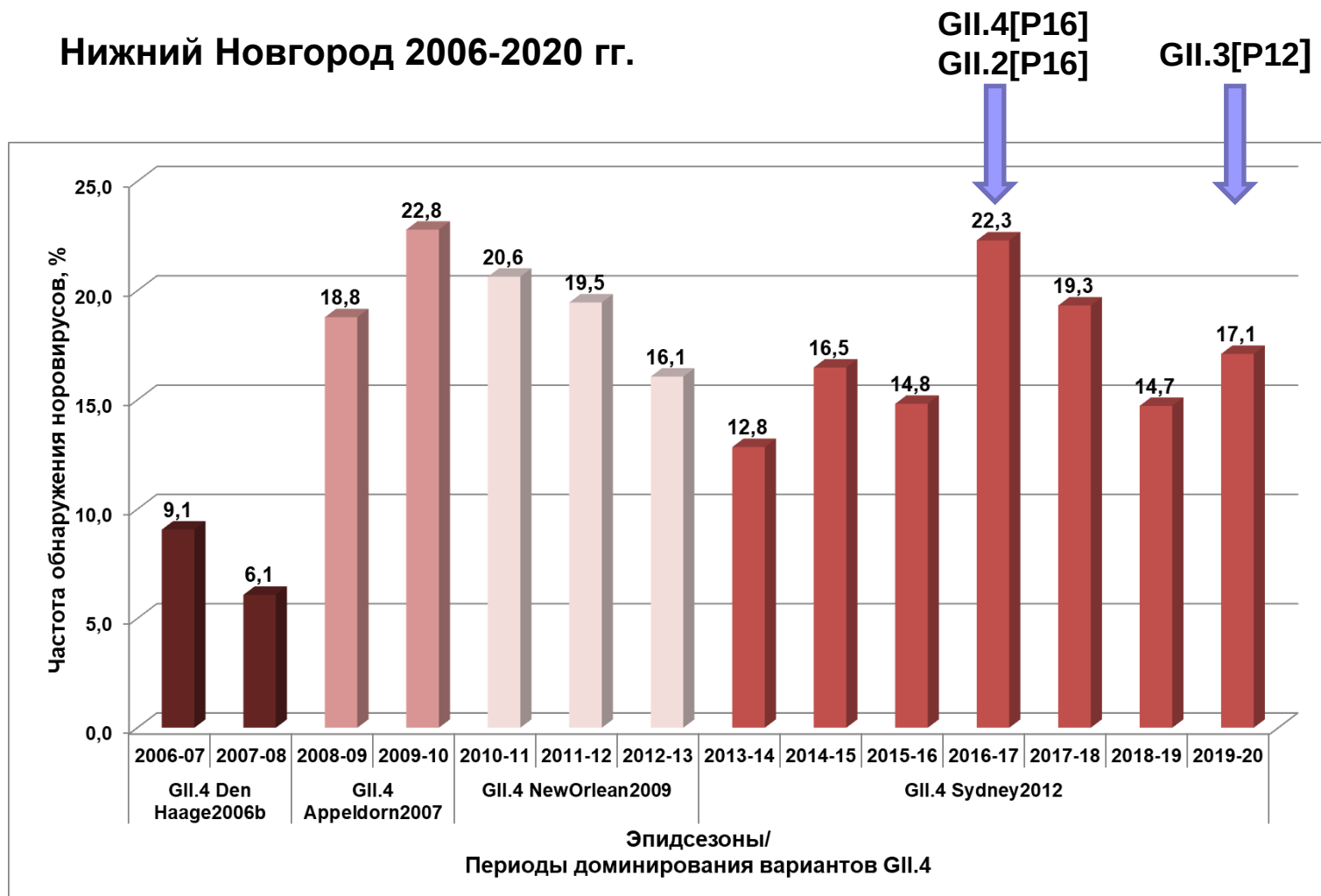
GII.4[P16]
GII.2[P16]



За период наших наблюдений с 2006 по текущий год на территории Нижнего Новгорода произошла смена четырех эпидемических вариантов норовируса генотипа GII.4., при полном вытеснении предыдущего варианта каждые два-три года. Однако последний эпидемический вариант GII.4 Sydney циркулирует уже на протяжении 7 лет. При этом в сезон 2016-17 гг. мы зафиксировали статистически значимое увеличение частоты выявления норовирусов по сравнению с предыдущим сезоном ($p < 0,001$) при появлении нового рекомбинанта варианта GII.4-Sydney – с полимеразой [P16]. Одновременно появился и рекомбинант генотипа GII.2 с такой же полимеразой. По всей вероятности, наблюдался суммарный эффект от появления этих двух новых рекомбинантов.

Увеличение частоты выявления норовирусов при появлении новых рекомбинантов

Нижний Новгород 2006-2020 гг.

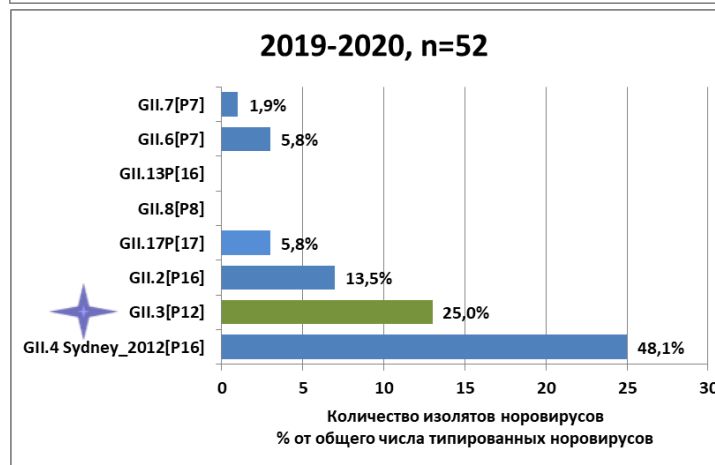
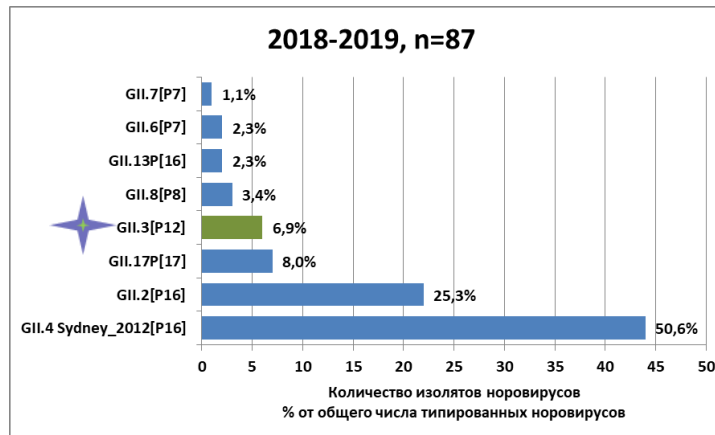


В последующие эпидсезоны генотипы GII.4[P16] и GII.2[P16] продолжали доминировать при снижении частоты выявления норовирусов. Однако в сезоне 2019-2020 гг. частота выявления норовирусов вновь статистически значительно увеличилась ($p=0,03$), что мы связываем с активизацией циркуляции нового для нашей территории рекомбинанта – GII.3[P12].

Спектр генотипов норовирусов, Нижний Новгород

Эпидсезоны	доля генотипа GII.3, %
2006-07	-
2007-08	-
2008-09	4,5
2009-10	11,1
2010-11	-
2011-12	10,0
2012-13	-
2013-14	-
2014-15	2,4
2015-16	-
2016-17	6,7
2017-18	1,2
2018-19	6,9
2019-20	25,0

**Рекомбинант GII.3[P12] впервые
выявлен в Нижнем Новгороде
в мае 2018 г.**



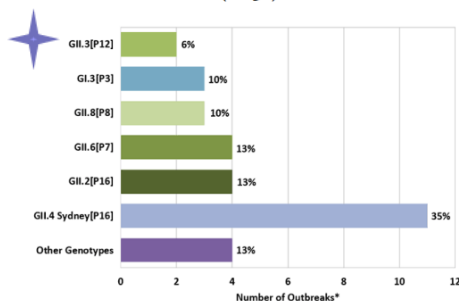
Генотип GII.3[P12] впервые был выявлен в Нижнем Новгороде в мае 2018 г. и по итогам сезона 2018-2019 гг. занял 4-е место в спектре генотипов с долей 6,9%, что было в пределах обычной многолетней ситуации для генотипа GII.3. Однако в сезоне 2019-2020 гг. он вышел на второе место и его доля составила 25,0%.

Спектр генотипов норовирусов, циркулирующих в США в 2019-2020 гг.



Genotype Distribution of Norovirus Outbreaks

September 1, 2019 – October 31, 2019
(n=31)

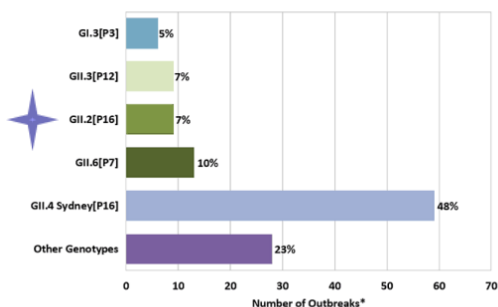


* Percent of total number of outbreaks shown in bar chart for each genotype category

The Other Genotypes category includes genotypes from outbreaks that each make up less than 5% of the total number of outbreaks.

Genotype Distribution of Norovirus Outbreaks

September 1, 2019 – December 31, 2019
(n=124)

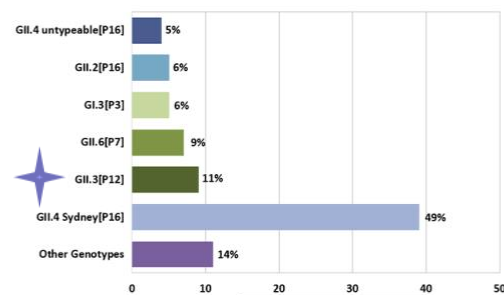


* Percent of total number of outbreaks shown in bar chart for each genotype category

The Other Genotypes category includes genotypes from outbreaks that each make up less than 5% of the total number of outbreaks.

Genotype Distribution of Norovirus Outbreaks

September 1, 2019 – November 30, 2019
(n=80)

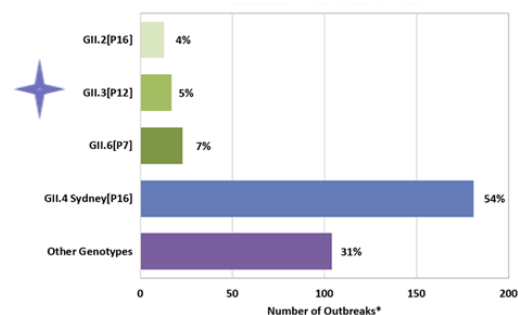


* Percent of total number of outbreaks shown in bar chart for each genotype category

The Other Genotypes category includes genotypes from outbreaks that each make up less than 5% of the total number of outbreaks.

Genotype Distribution of Norovirus Outbreaks

September 1, 2019 – July 31, 2020 (n=345)



The Other Genotypes category includes genotypes from outbreaks that each make up less than 5% of the total number of outbreaks.

<https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html>

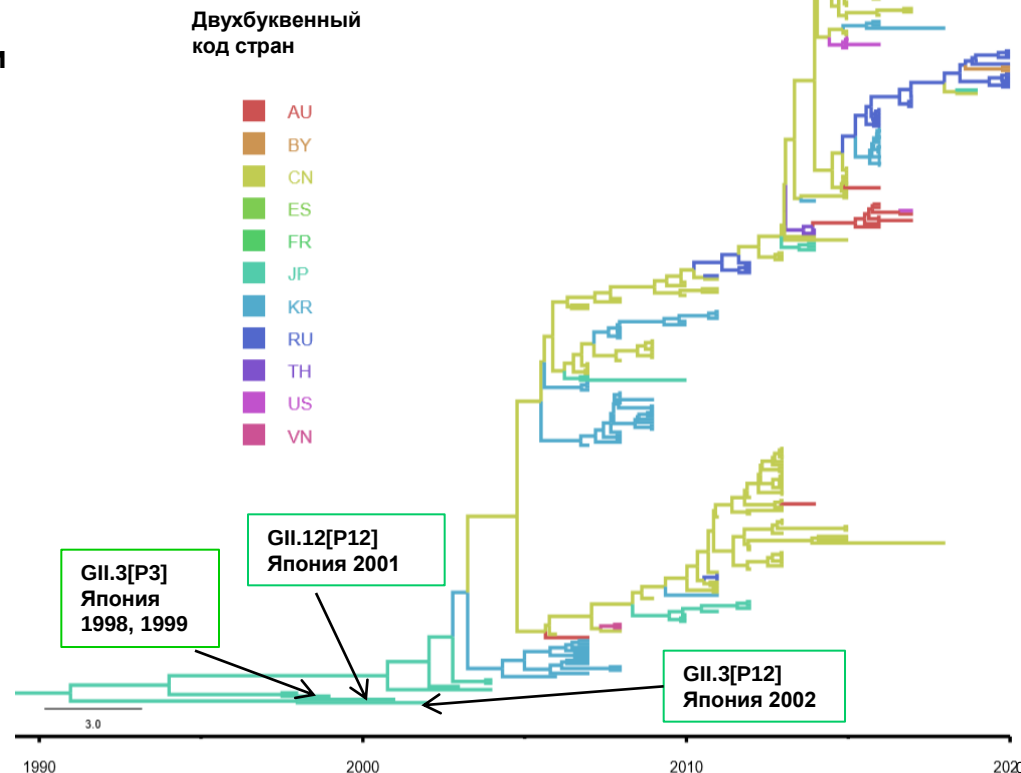
Мы посмотрели динамику циркуляции норовируса GI.3[P12] по другим доступным источникам информации. В частности, на сайте CDC в проекте CaliciNet ежемесячно обновляется спектр генотипов норовирусов, вызывающих вспышки НВИ на территории США. В эпидсезоне 2019-2020 г. доля рекомбинанта GI.3[P12] устойчиво превышала 5%, а на конец ноября 2019 года даже составляла 11%.

Циркуляция норовируса GII.3[P12] в 2002-2020 гг.

- ✓ На август 2020 г. в базе данных GenBank представлено около 300 последовательностей рекомбинанта GII.3P[12]
- ✓ Наиболее ранний изолят - AB112301_Saitama T82hGII, Япония 2002 г.
- ✓ В 2004-2018 гг. GII.3P[12] широко циркулировал в Китае, Южной Корее, Японии, Австралии, Вьетнаме, Таиланде.

Выявление норовируса GII.3[P12] за пределами Западно-Тихоокеанского региона и Юго-Восточной Азии

Страна	Город/штат	Год	Кол-во последовательностей
Россия RU	Новосибирск	2011	3
	Новосибирск	2012	2
	Красноярск	2012	2
	Смоленск	2012	1
	Новосибирск	2016	4
	Новосибирск	2017	6
	Н. Новгород	2018	2
	Н. Новгород	2019	6
	Н. Новгород	2020	12
США US		2015	3
	Анн-Арбор	2016	1
		2017	1
	Калифорния	2019	1
Франция FR		2018	1
Испания ES	Валенсия	2019	1
Белоруссия BY		2020	2



Мы провели анализ циркуляции этого рекомбинанта на основании публикаций и последовательностей, присутствующих в базе данных GenBank. На август 2020 г. в GenBank представлено около 300 последовательностей рекомбинанта GII.3P[12]. На слайде показано филогенетическое дерево, построенное на основе анализа зоны соединения генов полимеразы и капсидного белка норовирусов, размером 384 н.о. Наиболее ранний изолят – AB112301 (Япония 2002 г.) Вероятно, он возник в результате рекомбинации между норовирусами GII.3[P3] и GII.12[P12], которые в конце 1990-х - начале 2000-х годов циркулировали в Японии.

В 2004-2018 гг. этот рекомбинант широко распространился в Китае, Южной Корее, Японии, Австралии, Вьетнаме, Таиланде; был выявлен коллегами из Новосибирска на азиатской части России – в Новосибирске и Красноярске в период 2011-17 гг., а также в Смоленске в 2012 г.

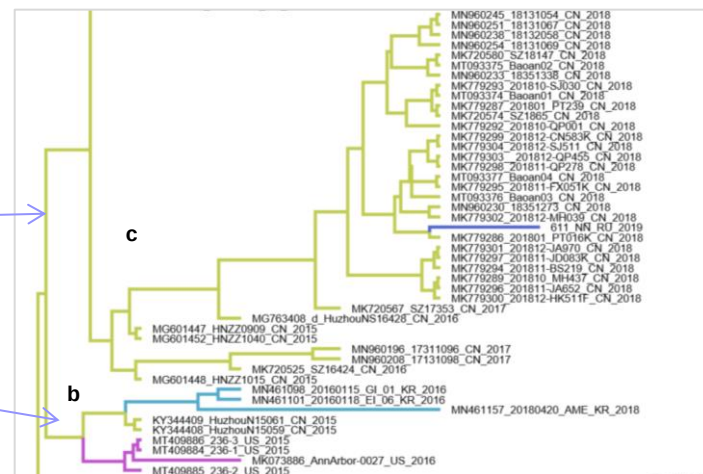
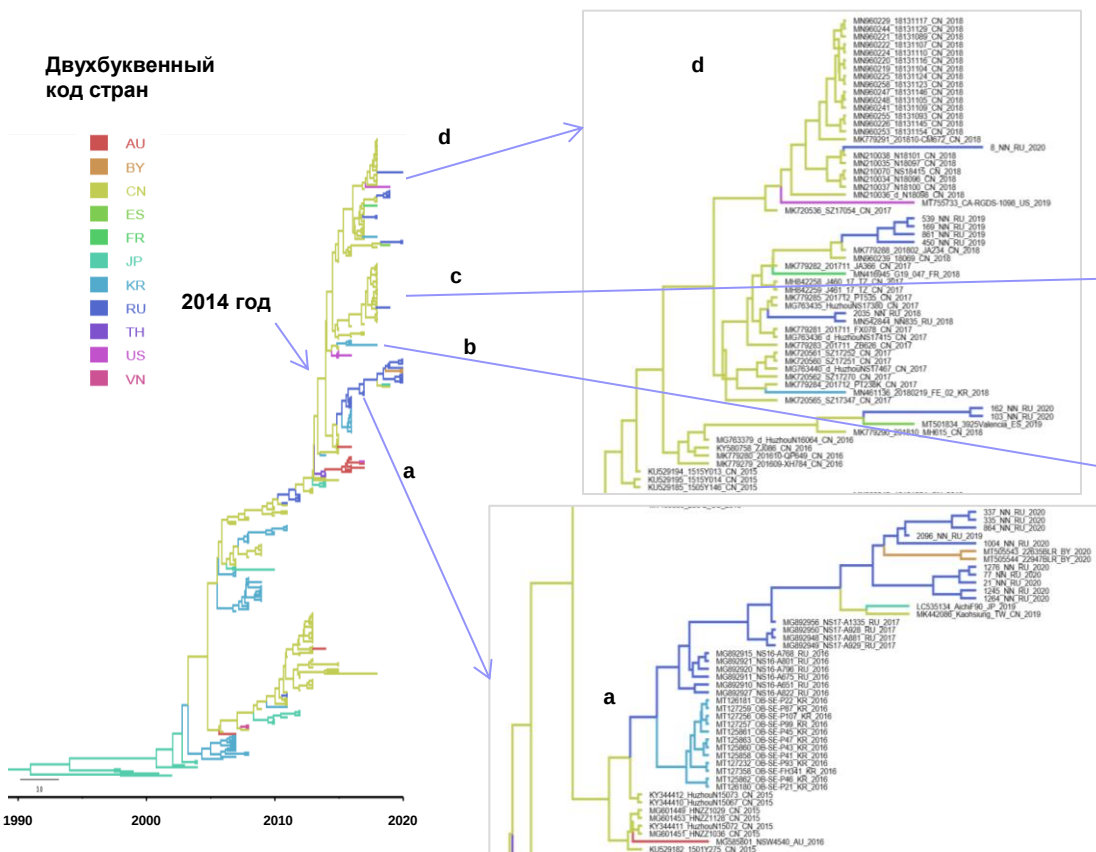
В 2015 г. появился в США, позднее – в Европе: в 2018 г. – во Франции, в 2019 г. – в Испании, в 2020 г. – в Белоруссии.

Филогенетический анализ норовируса генотипа GII.3[P12]

Двухбуквенный код стран

AU
BY
CN
ES
FR
JP
KR
RU
TH
US
VN

2014 год



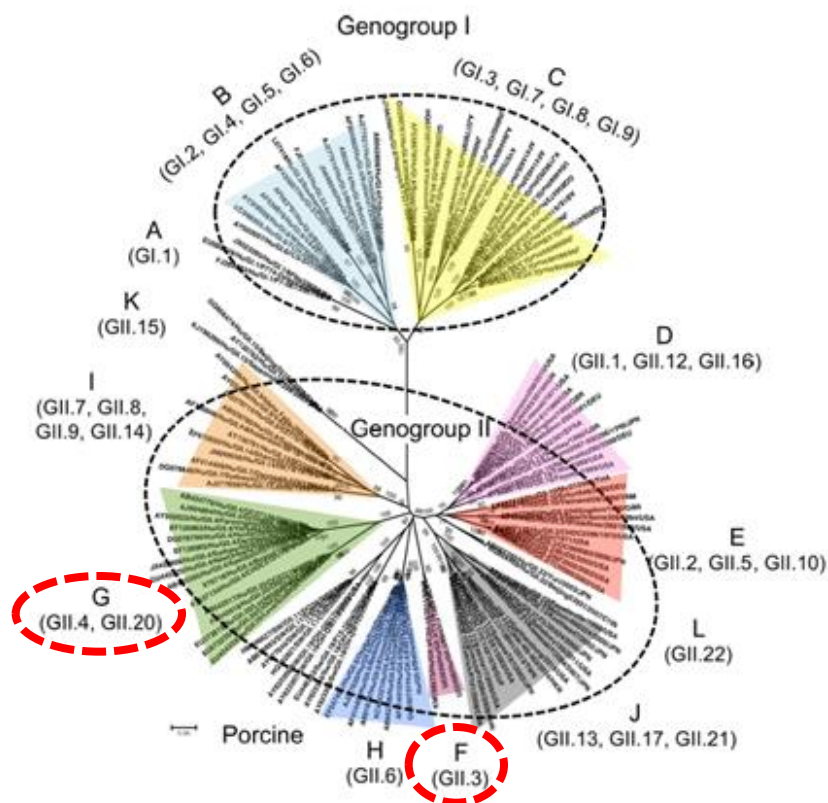
Зона соединения генов полимеразы и капсидного белка размером 384 н.о.

Филогенетическое дерево построено с использованием пакета программ BEAST v1.10.4 и визуализировано в программе FigTree v1.4.4

Около 2014 г. рекомбинант GII.3[P12] сформировал новую филогенетическую линию, которая сразу разделилась на четыре независимо эволюционирующие сублинии – a, b, c и d. Сублиния b содержит последовательности норовирусов из Китая, США и Южной Кореи, циркулировавших в 2015-2018 гг. Нижегородские изоляты входят в состав трех других сублиний: один входит в сублинию c, которая представлена кроме него только китайскими норовирусами; девять располагаются в сублинии a наряду с российскими изолятами (Новосибирск) 2016-17 гг. и двумя норовирусами, обнаруженными в Белоруссии в феврале 2020 года, и десять изолятов – в сублинии d, в которую, кроме китайских и корейского норовирусов входит два изолята из Европы (Франция, 2018 г., Испания, 2019 г.), и один – из США (2019 г.).

Принадлежность анализируемых нижегородских последовательностей к различным четко дифференцируемым филогенетическим сублиниям позволяет предположить, что циркуляция на территории Нижнего Новгорода рекомбинантов GII.3[P12] является результатом нескольких независимых заносов непосредственно из стран Западно-Тихоокеанского региона (сублинии c и d), либо через азиатскую часть России (сублиния a).

Концепция «иммунотипов» норовирусов



- Предложена на основании сопоставления филогенетического анализа аминокислотных последовательностей капсидного белка VP1 норовирусов разных генотипов и статистики реинфекций
- Выделено 12 кластеров, три в геногруппе I (A-C) и 9 – в геногруппе GII (D-L), каждый из которых включает от одного до четырех генотипов
- Большинство повторных инфекций было обусловлено вирусами разных «иммунотипов» (за исключением реинфекции различными эпидемическими вариантами GII.4)
- Генотип GII.3 относится к «иммунотипу» F

Parra G.I. et al. PLoS Pathog., 2017

Можно предположить дальнейшее распространение генотипа GII.3 на изучаемой территории в связи с низкой встречаемостью его ранее и отсутствием коллективного иммунитета. Это предположение может быть обосновано концепцией иммунотипов, предложенной в 2017 году американскими исследователями. Она разработана на основании сопоставления филогенетического анализа аминокислотных последовательностей капсидного белка VP1 норовирусов разных генотипов и статистики реинфекций. Выделено 12 кластеров, три в геногруппе I (A-C) и 9 – в геногруппе GII (D-L), каждый из которых включает от одного до четырех генотипов. Большинство повторных инфекций было обусловлено вирусами разных «иммунотипов» (за исключением реинфекции различными эпидемическими вариантами GII.4, иммунотип G). Генотип GII.3 относится к «иммунотипу» F.

Заключение

Генотиповая структура популяций норовирусов в эпидсезон 2019-2020 гг. характеризуется:

- **продолжающимся доминированием эпидемического варианта GII.4 Sydney[P16];**
- **снижением интенсивности циркуляции генотипов GII.2[P16] и GII.17[P17];**
- **активизацией циркуляции рекомбинанта GII.3[P12] на территории, где ранее он выявлялся в единичных случаях;**
- **возможно его широкое распространение в связи с вероятным отсутствием коллективного иммунитета к новому для данной территории «иммунотипу» норовируса.**



Спасибо за внимание!