



Всероссийская научно-практическая интернет-конференция с международным участием

«Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2020»

Молекулярная характеристика редких и реассортантных штаммов ротавируса А на основе всех сегментов генома

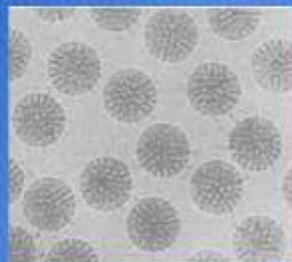
Т.А. Сашина, к.б.н., Н.А. Новикова, д.б.н.

Лаборатория молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»



Нижегород, Россия

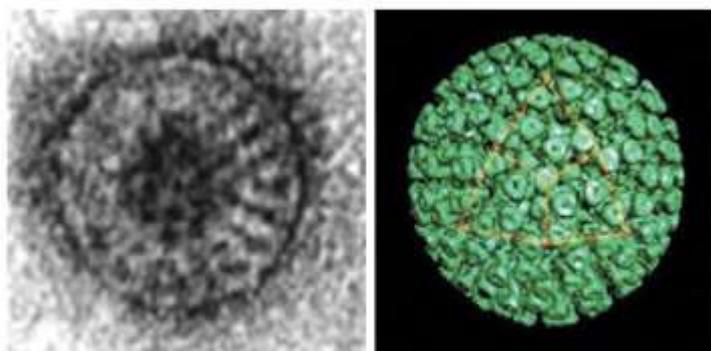
6 - 8 октября 2020 г.



РОТАВИРУСЫ

сем. *Reoviridae*,
род. *Rotavirus*

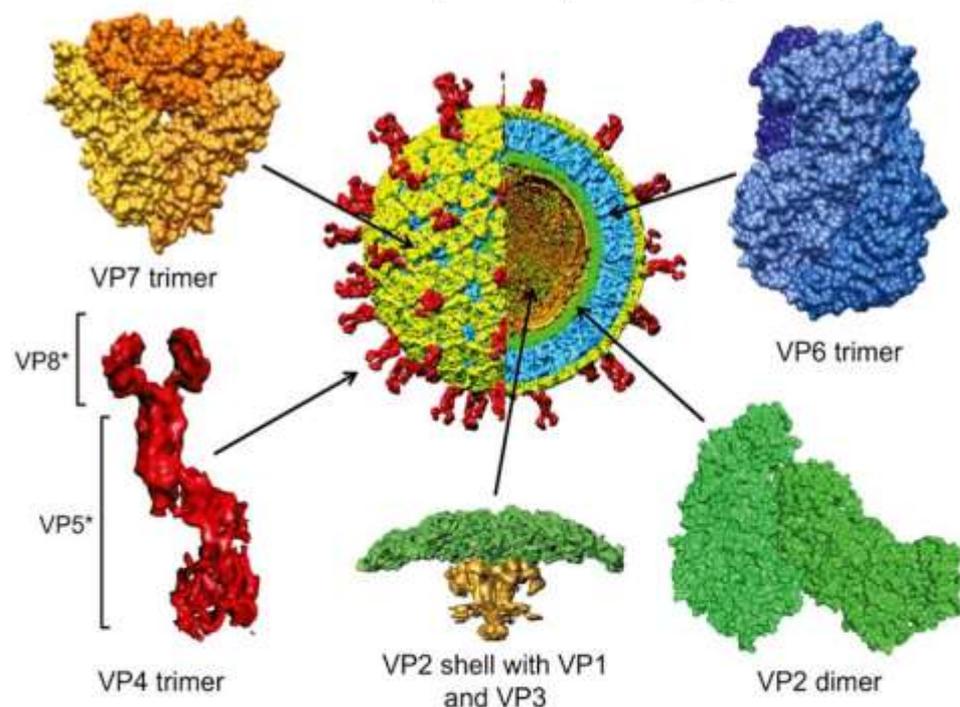
- Открыты в 1973 году Р. Бишоп с соавторами;
- Вирионы безоболочечные, трехслойные, двукапсидные, $d=100$ нм, $T=13$;
- Геном – 11 сегментов днРНК.



По оценкам (2016), ежегодно вызывают:

- 258 173 300 миллионов случаев гастроэнтерита;
- 128,5 тысяч смертей (104,7 тысяч - Центральная и Южная Африка)¹.
- В России в 2019 году - 70,3 на 100 тыс. населения

Строение вириона ротавируса²



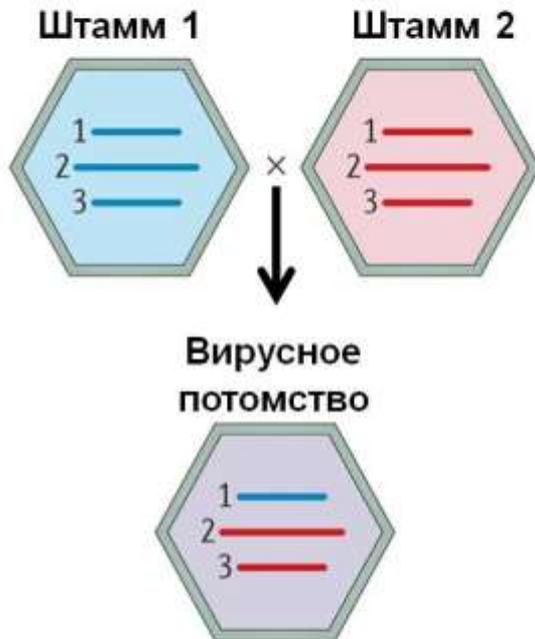
1 - C. Troeger, I.A. Khalil, P.C. Rao et al. *JAMA Pediatr.* 2018;172(10):958-965.

2 - Pesavento J.B., Crawford S.E., Estes M.K., Prasad B.V. *Cur. topics in microbiol. and immunol.* 2006. 309: 189-219.

Ротавирусная инфекция – важная проблема здравоохранения во всем мире. В России ротавирусы А ежегодно вызывают зимне-весенний подъем заболеваемости острым гастроэнтеритом детей младшего возраста. Вирион ротавирусов представляет собой 3-слойную частицу размером примерно 100 нм. Геном представлен 11-ю сегментами двунитевой РНК, которые кодируют 12 структурных и неструктурных белков.

Полногеномная классификация вида *Rotavirus A*

Реассортация



Сегменты генома ротавируса в ПААГ	Сегмент	Длина, п.н.	Белок	Генотип	Число известных генотипов
	1	3302	VP1	R	22
	2	2690	VP2	C	20
	3	2591	VP3	M	20
	4	2362	VP4	P	51
	5	1611	NSP1	A	31
	6	1356	VP6	I	26
	7	1104	NSP3	T	22
	8	1059	NSP2	N	22
	9	1062	VP7	G	36
	10	751	NSP4	E	1
	11	667	NSP5/6	H	22

Полный генотип обозначают акронимом

Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx

соответствует сегментам

VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6

*Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M. et al. Arch. Virol. 2008. 153. 1621–1629.
<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>*

Благодаря сегментированному геному ротавирусы способны к реассортации генов при коинфицировании клетки разными штаммами. В связи с этим, разные гены могут наследоваться независимо друг от друга. Поэтому, в 2008 году была разработана полногеномная система классификации ротавирусов, которая учитывает свойства всех сегментов их генома, что позволяет дать наиболее полную характеристику штаммов из разных стран.

Геногруппы ротавируса А человека

G1/3/4/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 – Wa-like, 1 геногруппа

G2P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 – DS-1-like, 2 геногруппа

Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations

Sarah M. McDonald¹
Philippe Lemey², Ma

¹ Laboratory of Infectious Diseases
² Laboratory of Clinical and Epid
³ The J. Craig Venter Institute, Ro

Abstract

Group A human rotaviruses (HRVs) are the most common cause of acute gastroenteritis in children and endemic human pathogens. In the 1970s, the Wa-like genotype G1P[8] was the dominant genotype in the United States and was typically associated with a significant increase in hospitalizations during the winter months. However, by the late 1990s, the DS-1-like genotype G2P[4] had become the dominant genotype in the United States, and this change was correlated with a significant decrease in hospitalizations during the winter months. The emergence of the DS-1-like genotype was associated with a change in the genome constellation of the virus, from a genotype with a single copy of each gene to a genotype with two copies of each gene. This change in genome constellation was necessary to anticipate

Citation: McDonald SM, Lemey P, et al. Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations. *J Virol*. 2008;82(22):11106-11116.

Diversity and Relationships of Cocirculating Modern Human Rotaviruses Revealed Using Large-Scale Comparative Genomics

Sarah M. McDonald,^a
Daniel C. Payne,^a Kat
Virginia Tech Carilion Rese
Veterinary Medicine, Blacks
Diseases, National Institute
Atlanta, Georgia, USA^b, and
USA

Group A rotaviruses (RVs) are 11-segmented, double-stranded RNA viruses that cause acute gastroenteritis in children. Despite the widespread use of rotavirus vaccine on circulating viruses, the diversity of RVs isolated from children during the years spanned by the vaccine trial (1998-2003) was similar to that of 11-R1-C1-M1-A1- results show evidence of different seasons maintaining community. By comparing available, we defined other regions of the amino acid changes comparative genomics in the community.

Analysis of Human Rotaviruses from a Single Location Over an 18-Year Time Span Suggests that Protein Coadaptation Influences Gene Constellations

Shu Zhang,^a Paul W. McDonald,^a Travis
Sarah M. McDonald^{a,d}

Virginia Tech Carilion School of Medicine and Res
Diseases, National Institutes of Health, Bethesda,
Pathobiology, Virginia-Maryland College

ABSTRACT

Rotaviruses (RVs) are 11-segmented, double-stranded RNA viruses that cause acute gastroenteritis in children. Such exchanges allow RVs to adapt to new environments, but may also impose fitness costs if that operate best when kept together. Sequences of 135 strains (genotype G1P[8]) were isolated from infected persons and adapted to cell culture to use as serotype references. Our sequencing results revealed that most of the individual proteins from each HRV belong to one of three genotypes (1, 2, or 3) based on their similarities to proteins of genogroup strains (Wa, DS-1, or AU-1, respectively). Strains D, P, ST3, IAL28, and WI61 encode genotype 1 (Wa-like) proteins, whereas strains DS-1 and 69M encode genotype 2 (DS-1-like) proteins. Of the 10 HRVs sequenced, 3 of them (Se584, A64, and L26) encode proteins belonging to more than one genotype, indicating that they are intergenogroup reassortants. We used amino acid sequence alignments to identify residues that distinguish proteins belonging to HRV genotype 1, 2, or 3. These genotype-specific changes cluster in definitive regions within each viral protein, many of which are sites of known protein-protein interactions. For the intermediate viral capsid protein (VP6), the changes map onto the atomic structure at the VP2-VP6, VP4-VP6, and VP7-VP6 interfaces. The results of this study provide evidence that group A HRV gene constellations exist and may be influenced by interactions among viral proteins during replication.

JOURNAL OF VIROLOGY, Nov. 2008, p. 11106-11116
0022-538X/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JVI.01402-08

Vol. 82, No. 22

Group A Human Rotavirus Genomics: Evidence that Gene Constellations Are Influenced by Viral Protein Interactions[†]

Erica M. Heiman,^{‡§} Sarah M. McDonald,[‡] Mario Barro,[¶] Zenobia F. Taraporewala,
Tamara Bar-Magen,^{||} and John T. Patton^{*}

Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health,
50 South Drive, MSC 8026, Room 6314, Bethesda, Maryland 20892-8026

Received 5 July 2008/Accepted 3 September 2008

Group A human rotaviruses (HRVs) are the major cause of severe viral gastroenteritis in infants and young children. To gain insight into the level of genetic variation among HRVs, we determined the genome sequences for 10 strains belonging to different VP7 serotypes (G types). The HRVs chosen for this study, D, DS-1, P, ST3, IAL28, Se584, 69M, WI61, A64, and L26, were isolated from infected persons and adapted to cell culture to use as serotype references. Our sequencing results revealed that most of the individual proteins from each HRV belong to one of three genotypes (1, 2, or 3) based on their similarities to proteins of genogroup strains (Wa, DS-1, or AU-1, respectively). Strains D, P, ST3, IAL28, and WI61 encode genotype 1 (Wa-like) proteins, whereas strains DS-1 and 69M encode genotype 2 (DS-1-like) proteins. Of the 10 HRVs sequenced, 3 of them (Se584, A64, and L26) encode proteins belonging to more than one genotype, indicating that they are intergenogroup reassortants. We used amino acid sequence alignments to identify residues that distinguish proteins belonging to HRV genotype 1, 2, or 3. These genotype-specific changes cluster in definitive regions within each viral protein, many of which are sites of known protein-protein interactions. For the intermediate viral capsid protein (VP6), the changes map onto the atomic structure at the VP2-VP6, VP4-VP6, and VP7-VP6 interfaces. The results of this study provide evidence that group A HRV gene constellations exist and may be influenced by interactions among viral proteins during replication.

4

Наиболее распространенные штаммы ротавируса человека генотипов G1P[8], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] почти без исключений имеют генотипы сегментов VP1-3, VP6 и NSP1-5 с номером 1. Такие штаммы относят к первой или Wa-подобной геногруппе. Штаммы генотипа G2P[4], как правило, имеют генотип остальных генов с номером 2. Такие ротавирусы относят ко второй или DS-1-подобной геногруппе.

В работах 2008-2014 гг. при исследовании коллекции штаммов РВА, выявленных в США в 1974-1991 гг., методом секвенирования, было показано отсутствие обмена генетическим материалом между двумя геногруппами. Было сделано предположение, что в популяции ротавирусов поддерживаются предпочтительные констелляции генов, обусловленные тесным взаимодействием белков, которые совместно эволюционировали на протяжении длительного времени. Таким образом, реассортантное вирусное потомство проигрывает в жизнеспособности вирусам, несущим эволюционно сформировавшиеся наборы генов.

Реассортантные штаммы ротавируса А

Моно-реассортанты обнаружены в единичных случаях:

- G1-P[8]-I1-R3-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1,
G1-P[8]-I1-R2-C1-M1-A1-N1-T2-E1-H1** – Бразилия, 2009-2011 (Santos et al. 2019)
- G9-P[8]-I1-R1-C1-M2-A1-N2-T1-E1-H1
G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N2-T1-E1-H1** – Венгрия, 2012 (Doro et al. 2014)
- G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N2-T1-E1-H1** – Китай, 2015-2016 (Dian et al. 2017)
- G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E2-H1** – Япония, 2018 (Fujii et al. 2019)
- G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N1-T2-E2-H2** – Япония, 1985-1990 (Doan et al. 2012)
- G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N1-T2-E2-H2** – Италия, 1996 (Giammanco et al. 2014)
- G9-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E6-H2,
G9-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T1-E2-H2** – Индия, 2009-2010 (Pradhan et al. 2016)
- G9-P[9]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T2-E1-H1,
G1-P[9]-I1-R1-C1-M3-A1-N1-T2-E1-H1,
G1-P[9]-I1-R1-C1-M2-A1-N2-T2-E1-H1,
G12-P[9]-I3-R3-C3-M3-A12-N3-T3-E3-H6** – Бразилия, 1997-1999 (Tsugawa et al., 2015)

Однако, в дальнейших работах, опубликованных в 2012-2020 гг., с применением полногеномной классификации были обнаружены реассортантные штаммы ротавируса А, имеющие смешанный набор генов разных геногрупп, в Японии, Венгрии, Италии и других странах. Например, спорадически были отмечены моно-реассортанты, отличающиеся только одним геном, характерным для другой геногруппы.

DS-1-подобные двойные реассортанты

G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2:

2012-2013 – появление во Вьетнаме и на Филиппинах, вспышки гастроэнтерита в Японии (Yamamoto et al., 2014, Nakagomi et al., 2017, Yamamoto et al., 2017)

2013 – появление в Таиланде, Бразилии, Малави (после начала вакцинации) (Komoto et al., 2015, Luchs et al., 2019, Jere et al., 2019)

2013-2015 – доминирование в Японии, Таиланде (Ono et al., 2020, Guntapong et al., 2017)

G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2:

2013-2014 – появление в Тайланде, 3-е место по распространенности (20,0%) (Guntapong et al., 2017, Yodmeeklin et al., 2018)

2015 – появление, распространение, доминирование во Вьетнаме (27 %) (Hoa-Tran et al., 2016)

2016-2019 – появление в Чехии (9,3 %) (Moutelikova et al., 2019)

2016 – вспышка у взрослых в Сингапуре (Chia et al., 2018)

2017 – вспышки гастроэнтерита в Австралии, третье место по распространенности (16 %) (Roczko-Farkas et al., 2018)

2014, 2017 – вспышки гастроэнтерита в Японии (Kondo et al., 2017, Kamiya et al., 2019)

Начиная с 2012 года накапливаются сообщения о появлении в мире двойных DS-1-подобных реассортантов, имеющих гены VP4 и VP7, характерные для первой геногруппы, а остальные гены – для второй геногруппы. Например, в Японии реассортантные штаммы генотипа G1P[8] составили 47 % случаев при исследовании ротавирусов, собранных в трех городах, и вызвали 12 вспышек ротавирусной инфекции в детских дошкольных учреждениях. Несколько позднее, сначала в Азии, а затем и в других странах отметили появление реассортантных ротавирусов генотипа G8P[8].

DS-1-подобные двойные реассортанты

G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, родственные ротавирусам лошадей:

2013 – появление и доминирование в Австралии (37,6 %) (Cowley et al., 2016)

2014 – появление в Тайланде, Доминиканской Республике (Tacharoenmuang et al., 2020, Katz et al., 2019)

2015 – появление в США, Германии, Японии, Бразилии, Испании, Венгрии (Perkins et al., 2017, Pietsch et al., 2018, Komoto et al., 2018, Kikuchi et al., 2018, Luchs et al., 2019, Guerra et al., 2016, Arana et al., 2016, Doro et al., 2016)

2016 – появление во Вьетнаме (Hoa-Tran et al., 2019)

2015 - 2018 – доминирование в Индонезии (70,8 %) (Utsumi et al., 2018, Athiyyah et al., 2019)

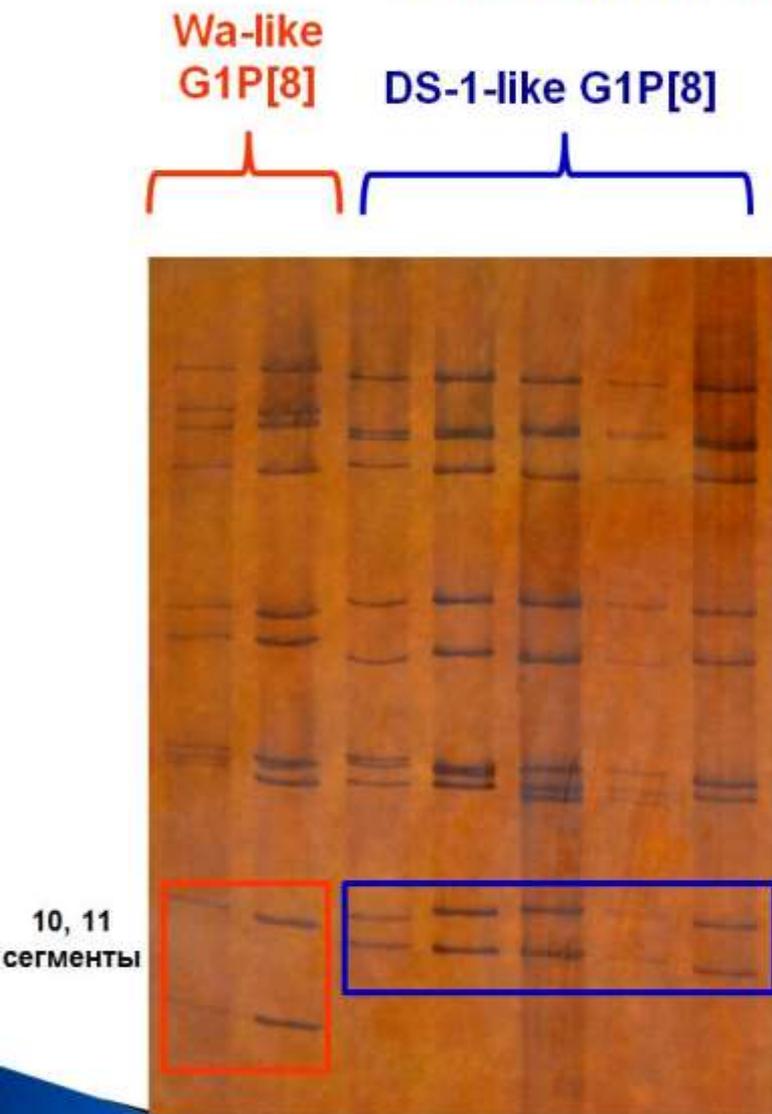
2016 – доминирование в Тайланде (89,8 %) (Tacharoenmuang et al., 2020)

2017 – вспышки гастроэнтерита в Австралии, второе место по распространенности (25 %), доминирование в регионах, где применяют вакцину Ротарикс (Roczko-Farkas et al., 2018)

2018 – появление в Италии у 8-ми летнего ребенка (Esposito et al., 2019)

В 2013 году в Австралии было впервые отмечено появление реассортантных штаммов генотипа G3P[8], родственных ротавирусам лошадей, которые преобладали на территории штатов, где применяли ротавирусную вакцину Ротарикс (54%). В последующие годы подобные ротавирусы распространились по всему миру.

Реассортантные штаммы ротавируса А в Нижнем Новгороде в 2013-2014 гг.



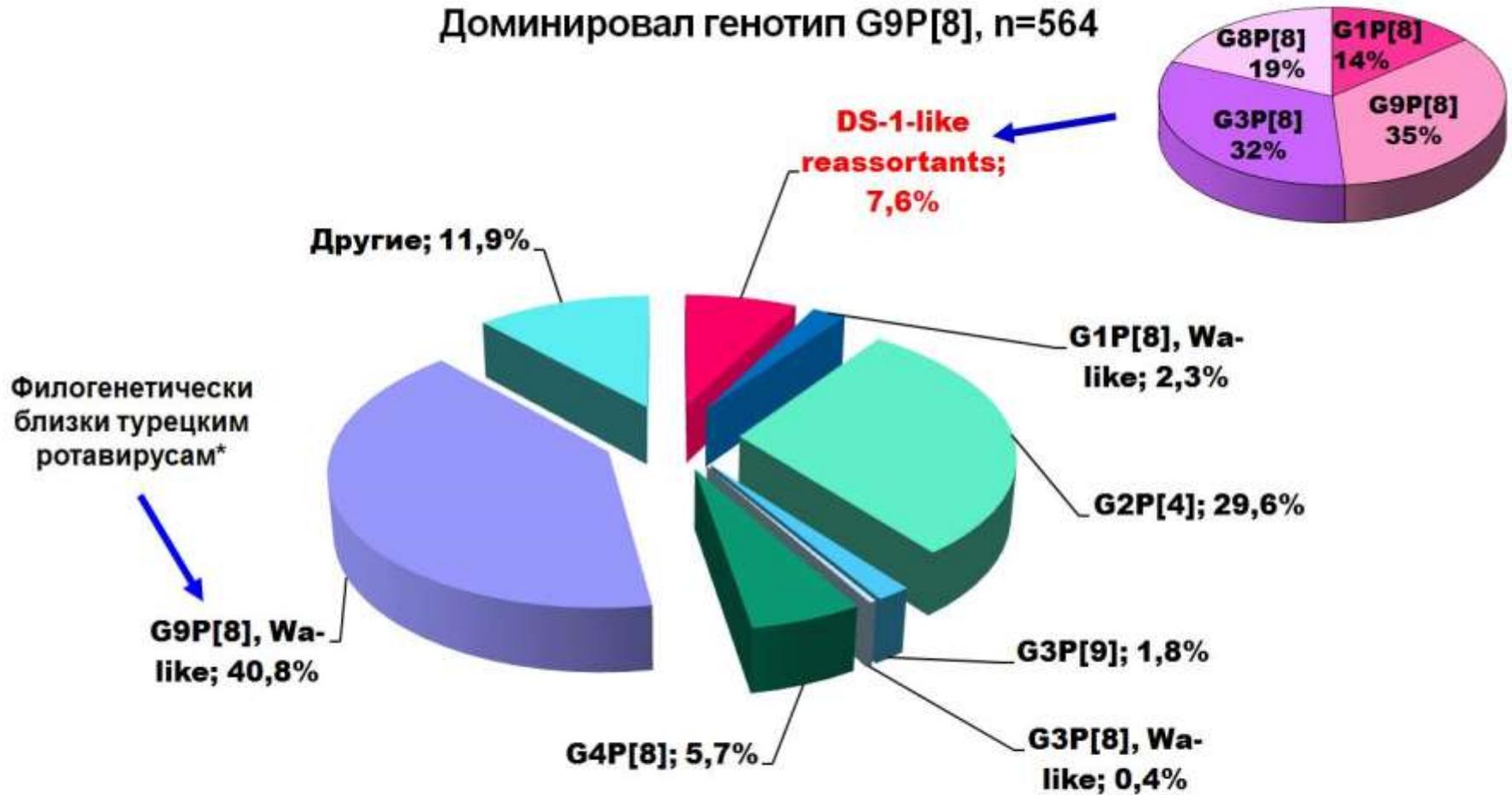
- Выявлены ротавирусы генотипа G1P[8] с коротким профилем миграции сегментов генома в ПААГ (2,6 % случаев)
- Получены нуклеотидные последовательности генов VP7, VP4, VP6 и NSP4
- На основе 4-х генов был определен генотип **G1-P[8]-I2-E2**
- Проведен филогенетический анализ. Нижегородские реассортантные штаммы имели полифилетическое происхождение

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 (2): 91-96.

Следует отметить, что в Нижнем Новгороде тоже были выявлены реассортантные штаммы. Ротавирусы 1 геногруппы характеризуются длинным профилем миграции сегментов генома в полиакриламидном геле, а 2 геногруппы – коротким. В сезон 2013-2014 гг. были обнаружены штаммы генотипа G1P[8], характерного для 1 геногруппы, с коротким профилем миграции сегментов. Секвенирование четырех генов показало генотип G1-P[8]-I2-E2, чем было подтверждено их реассортантное происхождение.

G,P-генотипы ротавируса А в Нижнем Новгороде, 2018-2020 гг.

Доминировал генотип G9P[8], n=564



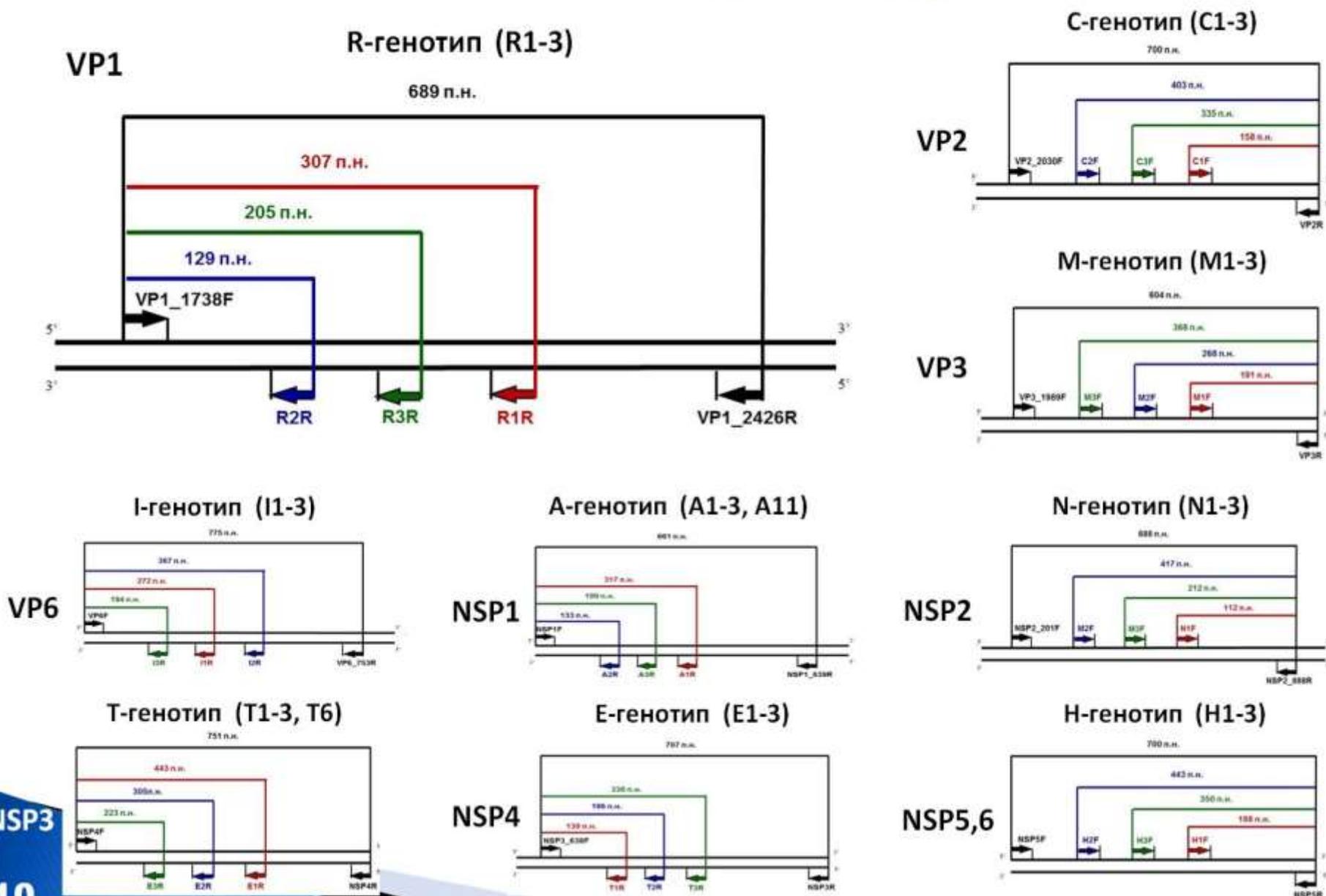
Всего показано 14 G,P-генотипов:

распространенные (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8])
и редкие (G2P[8], G3P[9], G4P[4], G4P[6], G6P[9], G8P[8], G9P[4], G9P[9])

* Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.
Arch Virol. 2017. 162. 2387-2392

В 2018-2020 гг. в Нижнем Новгороде при G,P-генотипировании штаммов РВА с применением мультиплексной ПЦР и секвенирования генов VP4 и VP7 было охарактеризовано разнообразие генотипов и показано доминирование генотипа G9P[8]. Однако, по результатам дополнительного анализа штаммов с помощью секвенирования фрагментов всех 11 генов, ПЦР для определения I- и E-генотипов и электрофореза РНК в полиакриламидном геле были показаны DS-1-подобные штаммы генотипов G1P[8], G3P[8], G8P[8] и G9P[8]. Их долевым вклад в типовую структуру популяции составил 7,6%.

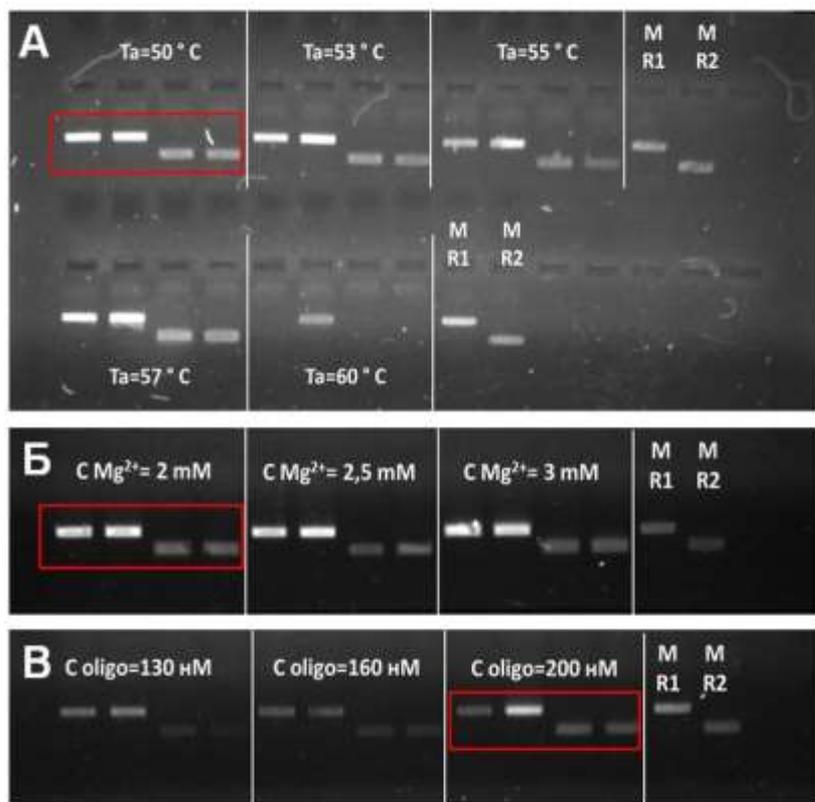
Подбор праймеров для определения полного генотипа ротавирусов



NSP3
10

Для быстрого определения полного генотипа была разработана методика на основе мультиплексной ПЦР, аналогичная таковой для G-,P-генотипирования. Для каждого сегмента генома, за исключением VP4 и VP7, были собраны выравнивания нуклеотидных последовательностей генотипов, наиболее распространенных среди штаммов, выделенных от людей. На данном слайде приведена схема посадки праймеров для определения R-генотипа сегмента, кодирующего белок вирусной РНК-полимеразы VP1. Был подобран общий для всех генотипов сегмента прямой и набор обратных праймеров, специфичных в отношении разных генотипов, так, чтобы они фланкировали разные по длине участки кДНК. Такие фрагменты могут быть разделены в агарозном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью. По аналогии были сконструированы наборы праймеров для идентификации других генотипов.

Подбор оптимальных условий постановки ПЦР для определения полного генотипа ротавирусов



Подбор условий проведения ПЦР для определения R-генотипа:

А – подбор оптимальной температуры отжига праймеров (Ta);
 Б – подбор оптимальной концентрации ионов магния в смеси;
 В – подбор оптимальной концентрации праймеров в смеси.

Условия постановки ПЦР для определения генотипов всех сегментов ротавирусов

Генотип	Температура отжига праймеров (Ta), °C	Концентрация ионов Mg ²⁺ , mM	Концентрация праймеров, нМ
R (VP1)	50	2,0	200
C (VP2)	55	3,0	160
M (VP3)	50	3,0	160
I (VP4)	57	2,0	130
A (NSP1)	55	2,5	200
N (NSP2)	50	3,0	160
T (NSP3)	53	2,0	160
E (NSP4)	55	2,5	130
H (NSP5,6)	53	2,5	160

Далее были эмпирически подобраны оптимальные условия постановки реакции для идентификации генотипа каждого сегмента. Были проведены серии ПЦР с различными значениями температуры отжига праймеров, концентрации ионов магния и концентрации праймеров в реакционной смеси. На слайде в качестве примера показаны результаты ПЦР с разными условиями для определения R-генотипа ротавирусов. В таблице приведены рекомендуемые условия амплификации фрагментов кДНК для определения генотипов всех сегментов генома ротавирусов.

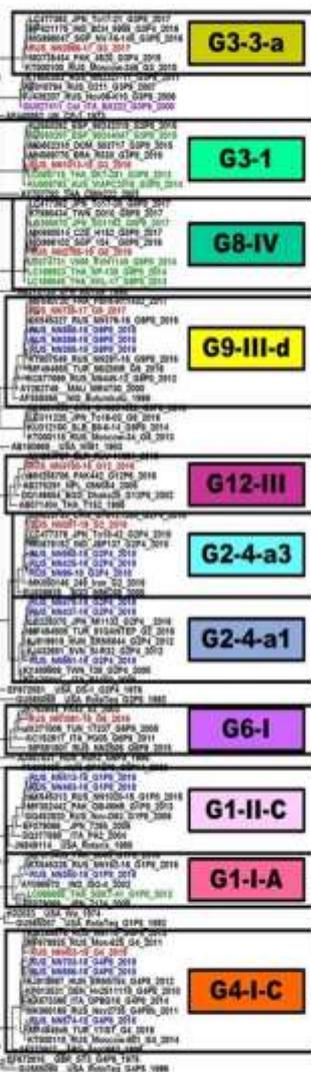
Полные генотипы ротавирусов, установленные с помощью мультиплексной ПЦР

№	Штамм	G (VP7)	P (VP4)	I (VP6)	R (VP1)	C (VP2)	M (VP3)	A (NSP1)	N (NSP2)	T (NSP3)	E (NSP4)	H (NSP5)
Wa-подобные штаммы												
1.	350/18	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
2.	413/18	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
3.	463/18	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
4.	574/18	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
5.	385/18	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
6.	386/18	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
7.	568/18	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
8.	3150/16	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
9.	2866/17	G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
DS-1-подобные штаммы												
10.	96/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
11.	425/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
12.	437/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
13.	478/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
14.	560/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
15.	861/18	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
Реассортантные штаммы												
16.	566/18	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E2	H1
17.	703/18	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E2	H1
18.	735/17	G9	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
19.	387/19	G2	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
20.	403/19	G4-	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
21.	1013/18	G3	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
22.	2785/18	G8	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
23.	1061/16	G6	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T3	E2	H3

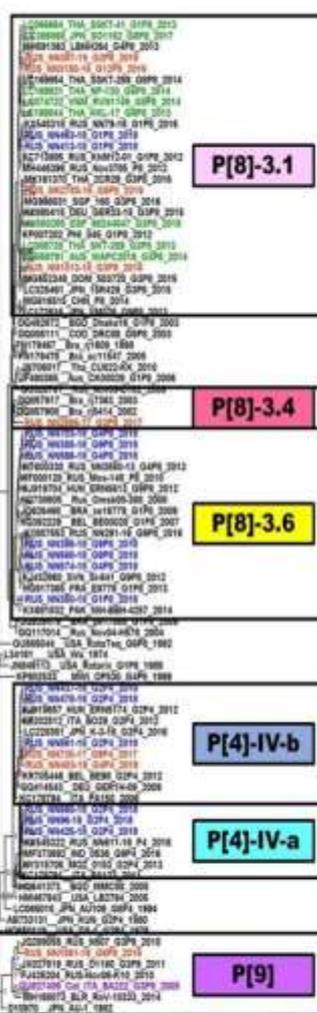
С помощью разработанной методики определены полные генотипы 23 штаммов РВА, выявленных в Нижнем Новгороде в 2016-2019 гг. Кроме того, для каждого гена изучаемых штаммов методом секвенирования был получен фрагмент нуклеотидной последовательности длиной от 600 до 900 н.п., что позволило определить генотипы общепринятым способом. Данные, полученные методом секвенирования совпали с результатами мультиплексной ПЦР. Таким образом, охарактеризованы генотипы нижегородских Wa- и DS-1-подобных штаммов. При анализе редких и необычных ротавирусов были обнаружены моно-реассортанты, двойные реассортанты и штамм, имеющий генотипов трех сегментов с номером 3.

Филогенетические деревья, построенные на основе генов VP7, VP4 и VP6 ротавирусов

VP7



VP4



VP6

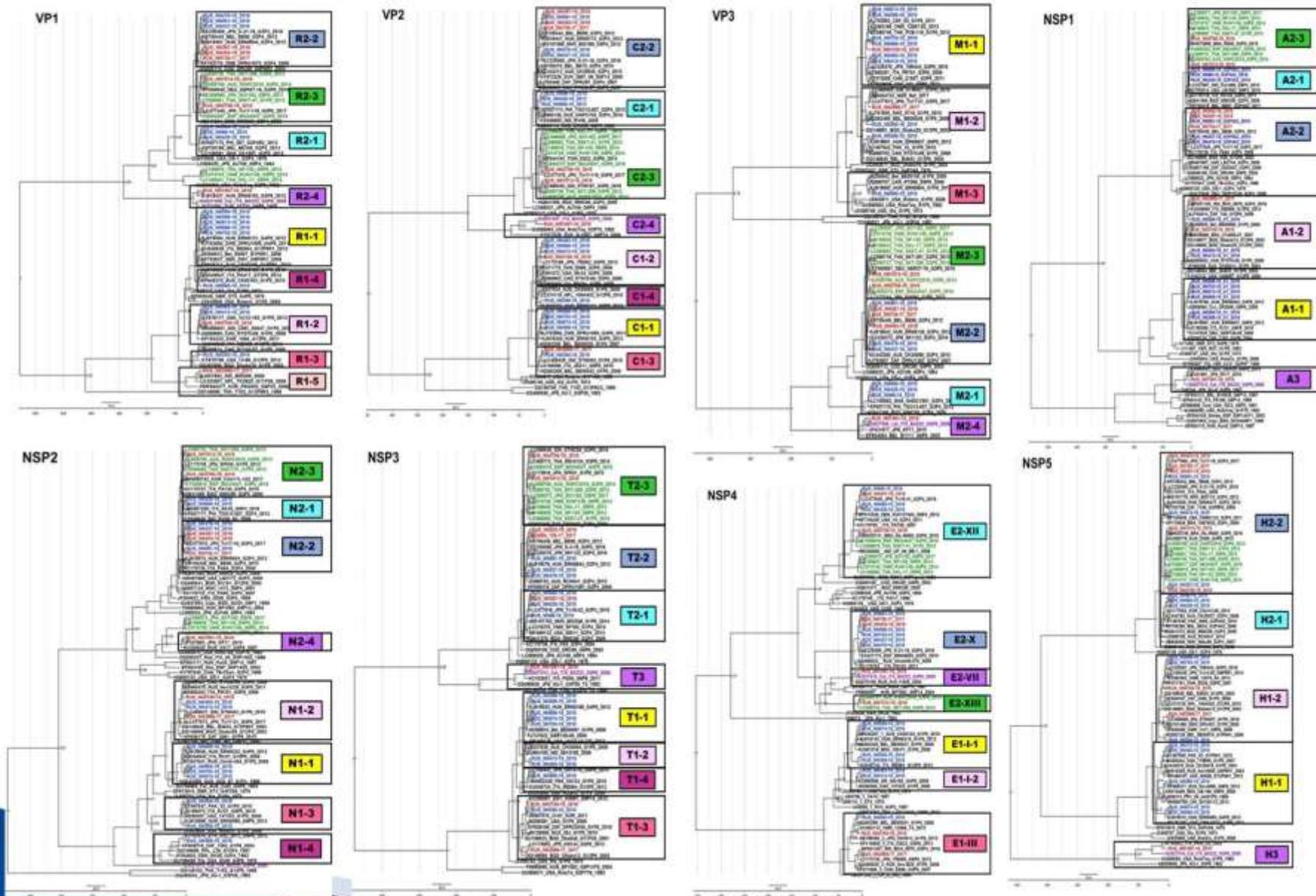


Красным цветом отмечены редкие и реассортантные нижегородские штаммы PVA
Синим цветом отмечены нижегородские PVA Wa- и DS-1-подобной генотипов
Зеленым цветом отмечены двойные DS-1-подобные реассортанты из других стран
Фиолетовым цветом отмечен штамм PVA кошки BA222 (Италия, 2005)

13

На основе полученных нуклеотидных последовательностей всех 11 сегментов генома ротавирусов был проведен филогенетический анализ и изучено разнообразие штаммов на субгенотиповом уровне. В случае генов VP7 и VP4 нижегородские ротавирусы имели 11 и 6 вариантов, обозначенных согласно принятой в литературе классификации. Реассортантные штаммы генотипов G3P[8] и G8P[8] по данным генам группировались с аналогичным штаммам из Вьетнама, Испании, Тайланда и Японии. По гену VP6, однако, штамм генотипа G8P[8] был родственен ротавирусам из Нижнего Новгорода.

Филогенетические деревья, построенные на основе генов VP1-VP3, NSP1-NSP5/6 ротавирусов



Для остальных сегментов генома нами было выделено от пяти (VP6, NSP5) до девяти (VP1) вариантов. DS-1-подобные двойные реассортанты генотипов G3P[8] и G8P[8] были близкородственны аналогичным штаммам из других стран, сформировав на филогенетических деревьях отдельные кластеры, которые не включали другие нижегородские штаммы.

Комбинации аллелей всех сегментов генома ротавирусов, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2016-2019 гг.

№	Штамм	Гены										
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Wa-подобные штаммы												
1	350/18	G1-I-A	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-3	C1-3	M1-2	A1-2	N1-3	T1-3	E1-III	H1-2
2	413/18	G1-II-C	P[8]-3.1	I1-I-1	R1-2	C1-2	M1-1	A1-2	N1-2	T1-2	E1-I-2	H1-1
3	463/18	G1-II-C	P[8]-3.1	I1-I-1	R1-2	C1-2	M1-1	A1-2	N1-2	T1-2	E1-I-2	H1-1
4	574/18	G4-I-C	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-1	C1-1	M1-1	A1-1	N1-1	T1-1	E1-I-1	H1-1
5	385/18	G9-III-d	P[8]-3.6	I1-I-2	R1-1	C1-4	M1-2	A1-1	N1-3	T1-1	E1-I-1	H1-1
6	386/18	G9-III-d	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-1	C1-1	M1-1	A1-1	N1-4	T1-1	E1-I-1	H1-1
7	568/18	G9-III-d	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-4	C1-2	M1-3	A1-1	N1-1	T1-4	E1-I-1	H1-1
8	3150/16	G12-III	P[8]-3.1	I1-I-1	R1-2	C1-2	M1-1	A1-2	N1-2	T1-3	E1-III	H1-2
9	2866/17	G3-3-a	P[8]-3.4	I1-I-1	R1-5	C1-3	M1-2	A1-2	N1-2	T1-3	E1-III	H1-2
DS-1-подобные штаммы												
10	96/18	G2-4-a3	P[4]-IV-b	I2-VII-1	R2-1	C2-1	M2-1	A2-1	N2-1	T2-1	E2-XII	H2-1
11	425/18	G2-4-a3	P[4]-IV-b	I2-VII-1	R2-1	C2-1	M2-1	A2-1	N2-1	T2-1	E2-XII	H2-1
12	560/18	G2-4-a3	P[4]-IV-b	I2-VII-1	R2-1	C2-1	M2-1	A2-1	N2-1	T2-1	E2-XII	H2-1
13	437/18	G2-4-a1	P[4]-IV-a	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-2	E2-X	H2-2
14	478/18	G2-a-1	P[4]-IV-a	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-2	E2-X	H2-2
15	861/18	G2-a-1	P[4]-IV-a	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-2	E2-X	H2-2
Моно-реассортанты												
16	566/18	G4-I-C	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-1	C1-1	M1-1	A1-1	N1-1	T1-1	E2-X	H1-2
17	703/18	G4-I-C	P[8]-3.6	I1-I-1	R1-1	C1-1	M1-1	A1-1	N1-1	T1-1	E2-X	H1-2
18	735/17	G9-III-d	P[4]-IV-a	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-2	E2-X	H2-2
19	387/19	G2-4-a3	P[8]-3.1	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-1	E2-XII	H2-2
20	403/19	G4-I-C	P[4]-IV-a	I2-VII-2	R2-2	C2-2	M2-2	A2-2	N2-2	T2-2	E2-X	H2-2
DS-1-подобные двойные реассортанты												
21	1013/18	G3-1	P[8]-3.1	I2-VII-1	R2-3	C2-3	M2-3	A2-3	N2-3	T2-3	E2-XIII	H2-2
22	2785/18	G8-IV	P[8]-3.1	I2-VII-2	R2-3	C2-3	M2-3	A2-3	N2-3	T2-3	E2-XII	H2-2
Штамм, родственник ротавирусу кошачьих												
23	1061/16	G6-I	P[9]	I2-IV	R2-4	C2-4	M2-4	A3	N2-4	T3	E2-VII	H3

15

Обобщая полученные данные, всего было показано как минимум 17 сочетаний внутригенотиповых аллелей у ротавирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде. Wa-подобные штаммы характеризовались наличием восьми сочетаний. Штаммы генотипа G2P[4] имели две стабильные комбинации, которые различающиеся по всем 11-ти сегментам генома, что означает четкое разделение ротавирусов в популяции на два генетических варианта. Реассортанты генотипов G3P[8] и G8P[8] были близкородственны аналогичным штаммам из Вьетнама, Испании, Тайланда, Японии по одиннадцати и десяти генам, соответственно. Это позволяет предположить, что изначально они были завезены на территорию России. В то же время, вариант генотипа G8P[8] имел дивергентный ген VP6, общий с нижегородскими ротавирусами генотипа G2P[4], что может свидетельствовать о произошедшем обмене генетическим материалом с местными штаммами и об их продолжающейся эволюции в популяции Нижнего Новгорода.

Выводы

- На территории России (Нижний Новгород) выявлены эпидемически значимые реассортантные DS-1-подобные штаммы ротавируса;
- Разработана ПЦР-методика полногеномного типирования ротавирусов;
- Установлены полные генотипы 23 штаммов РВА, выявленных в Нижнем Новгороде;
- Показаны 17 сочетаний аллелей генов нижегородских ротавирусов.

Заключение

- Для мониторинга циркуляции ротавирусов целесообразно использовать полногеномную классификацию, т.к. штаммы генотипов G1P[8], G3P[8], G9P[8] могут быть двойными реассортантами;
- Для подробной характеристики штаммов РВА важен филогенетический анализ на основе всех генов, т.к. варианты, несущие консервативные гены VP7 и VP4, могут иметь разные аллели других генов;

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

