

Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Быков Роман Олегович

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НОРОВИРУСОВ В СВЕРДЛОВСКОЙ
ОБЛАСТИ (ТЕРРИТОРИАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

Специальность: 1.5.10 – вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
А.В. Семенов

Санкт-Петербург – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
2.1. Общая характеристика норовирусов: таксономическое положение, морфология и ультраструктура, стадии репликативного цикла, номенклатурные критерии, мутационная изменчивость.	17
2.2. Генетическое разнообразие возбудителей НВИ.	25
2.2.1. Мировые тенденции распределения норовирусных генотипов.	25
2.2.2. Генотипический профиль возбудителей НВИ на территории Российской Федерации	27
2.2.3. Эпидемиологическая характеристика НВИ на территории Свердловской области.....	30
2.2.4. Влияние однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT на генетически детерминированную невосприимчивость к возбудителю НВИ.....	32
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
3.1. Реактивы и материалы.	35
3.2. Алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов.	38
3.3. Биологические образцы.	40
3.4. Выделение нуклеиновой кислоты норовирусов и генов FUT, ПЦР, секвенирование методом Сэнгера.	46
3.5. Проведение секвенирования нуклеотидных последовательностей полноразмерных норовирусных геномов методом next-generation sequencing (NGS).	52
3.5.1. Приготовление NGS-библиотек по протоколу SMART-9N	52
3.5.2. Разработка оригинального протокола обогащения нуклеиновых кислот генотипов GII.4[P16], GII.7[P7] для реализации последующего секвенирования методом NGS.....	55

3.5.3. Подготовка NGS-библиотек с использованием способа обогащения норовирусного генома.....	55
3.5.4. Измерение концентрации NGS-библиотек, подготовленных на основе протокола SMART-9N и протокола обогащения.....	62
3.6. Биоинформационная обработка нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома, полноразмерных геномов норовирусов.....	63
3.7. Применение алгоритмов множественного выравнивания, филогенетический анализ, построение матрицы генетических дистанций.....	64
3.7.1. Формирование набора референсных последовательностей и оценка генетической дивергентности.....	66
3.8. Используемые статистические методы обработки данных.....	67
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	69
4.1. Генетическая характеристика идентифицированных нуклеотидных последовательностей норовирусных генотипов на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.....	69
4.2. Анализ встречаемости генетических групп GI-GII в различных возрастных контингентах на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.....	75
4.3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома.....	82
4.3.1. Филогенетический анализ генотипов, относящихся к геногруппе GI, идентифицированных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.	82
4.3.2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей норовирусов, относящихся к геногруппе GII, идентифицированных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.	87

4.4. Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента главного капсидного белка VP1 норовирусов, входящих в состав преобладающего генотипического профиля (GII.4[P16], GI.7[P7], GI.17[P17]), идентифицированных на территории Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.....	96
4.5. Идентификация полноразмерных геномов норовирусов.....	102
4.5.1. Секвенирование методом NGS нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов (full-length genomes) норовирусов GI.4, GI.7.....	102
4.5.2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов (full-length genomes) норовирусов генотипов GI.4, GI.7, идентифицированных на территории Свердловской области в 2024 году	103
4.6. Реконструкция 3D-моделей антигенных детерминант главного капсидного белка VP1.	107
4.6.1. Исследование несинонимичных замен в последовательностях полноразмерного гена VP1 у генотипов GI.4[P16], GI.7[P7].....	107
4.6.2 Анализ рекомбинационной изменчивости актуального генотипа GI.7[P7], обнаруженного на территории Свердловской области в 2024 году	112
4.7. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов генов FUT в популяции добровольцев в Екатеринбурге за аналитический период 2024 г.	115
5. ОБСУЖДЕНИЕ.....	125
5.1. Особенности генотипического профиля и эпидемиологическая динамика норовирусной инфекции в Свердловской области.	125
5.2. Филогенетическая характеристика доминирующих норовирусных генотипов в Свердловской области в контексте глобальной циркуляции.....	128
5.3. Рекомбинация как ключевой двигатель эволюции и возникновения эмерджентных норовирусов.....	130

5.4. Мутационная изменчивость и функциональные изменения структурного белка VP1.....	132
5.5. Генетическая невосприимчивость хозяина, роль полиморфизмов генов FUT.....	134
5.6. Методологические нововведения, ограничения исследования и пути их преодоления.....	135
5.7. Полученные результаты, практическая значимость и стратегические перспективы.....	136
6. ВЫВОДЫ	138
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	140
8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	142
9. ПРИЛОЖЕНИЕ	162
9.1. Приложение 1	162
9.2. Приложение 2	176
9.3. Приложение 3	181

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Норовирус является одним из самых распространенных этиологических агентов, приводящих к возникновению инфекционного гастроэнтерита у человека. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно регистрируется около 685 миллионов случаев инфицирования возбудителем норовирусной инфекции человека (НВИ), в том числе 200 миллионов случаев заражения приходится на детей в возрасте до 5 лет [114, 121]. Глобальное бремя инфекционной патологии представляет значимую проблему для мирового здравоохранения, в частности для здравоохранения Российской Федерации. Совокупный экономический ущерб по всему миру составляет 60 млрд. долларов США в год (прямые расходы системы здравоохранения – 4,2 млрд., ущерб от временной утраты трудоспособности – 56,2 млрд [23]).

Было продемонстрировано, что заболеваемость норовирусным гастроэнтеритом значительно варьируется в зависимости от региона. Самый низкий годовой уровень заболеваемости был зарегистрирован в регионе Юго-Восточной Азии (534,3 на 100 тыс.), а самый высокий годовой уровень заболеваемости в регионе Восточного Средиземноморья, который охватывает страны Аравийского полуострова, Северо-Восточной Африки и Юго-Западной Азии (1820,3 на 100 тыс.) [134]. Самые высокие показатели летальности были обнаружены в странах ЮАР, которые, по оценкам, составляли 0,7 летальных исходов на 100 тыс. населения [134]. В постковидный период в многолетней динамике НВИ в Российской Федерации регистрируется тенденция к непрерывному росту показателей заболеваемости (34,5 на 100 тыс. населения). При этом Свердловская область является одним из субъектов РФ с наибольшим уровнем заболеваемости. Норовирусный гастроэнтерит человека вызывается норовирусами, относящимися к пяти геногруппам: GI, GII, GIV, GVIII, GIX, включающие определенные генотипы и Р-типы, которые вызывают как эпизоды групповой заболеваемости в организованных коллективах [44]. Глобальные

эпидемии неизменно вызываются различными штаммами GII.4, поскольку появляется все больше новых геновариантов, заменяющих ранее циркулирующие штаммы [147]. Однако появление новых штаммов GII.17 в Азии и рекомбинантного штамма GII.P16-GII.2 в Европе подчеркивают географические различия в молекулярной эпидемиологии норовируса, повышая вероятность того, что новые эмерджентные норовирусы последовательно сменят доминирующий GII.4 во всем мире [28, 48]. Стоит отметить важность проведения анализа эволюционных механизмов, обуславливающих формирование новых геновариантов норовируса внутри генетических групп для контроля за инфекционной заболеваемостью в человеческой популяции. Из-за высокой частоты рекомбинационной изменчивости норовирусов необходим подбор более эффективной модели мониторинга за генетическим разнообразием возбудителей НВИ.

Хотя в эпидемический процесс вовлекаются все возрастные группы людей, тяжесть исходов заболевания существенно варьируется в различных возрастных группах [77, 138]. Дети от 1 до 5 лет больше других подвержены инфицированию возбудителем НВИ, о чем свидетельствует более частое посещение амбулаторных учреждений, отделений неотложной помощи, а также госпитализаций в стационары [74, 100]. Однако тяжелое течение заболевания чаще регистрируется у пожилых людей в возрасте 65 лет и старше [21, 79]. Среди реактивной человеческой популяции, у которой отсутствуют патологические нарушения иммунной системы, характеризующие нормальный иммунный статус, норовирусы обычно вызывают острую манифестацию клинических симптомов с закономерным разрешением инфекционного процесса и наступлением периода реконвалесценции. Кроме того, люди с иммунодефицитными состояниями тяжелее переносят эпизоды норовирусного гастроэнтерита, у подобных пациентов наблюдается тенденция к хронизации воспалительного инфекционного процесса с длительным персистированием возбудителя в организме [12, 69, 113].

Норовирусы относятся к высококонтагиозным и высоковирулентным энтеральным вирусам. По оценкам исследователей, инфицирующая доза, достаточная для инфицирования 50% лабораторных животных (ID) составляет от

18 до 2800 вирусных частиц [22, 152]. Проявления клинического процесса способны выражаться в виде инаппарантных форм течения болезни, острой манифестной формы и носительства. Основной симптомокомплекс преимущественно состоит из рвотных позывов, водянистой диарей без крови, спазмами мышц живота, лихорадкой, интоксикационным синдромом [52, 80]. Дети в возрасте до года чаще переносят симптомы диареи, когда сочетание рвотных позывов и диареи присутствует у лиц старше 1 года, средняя продолжительность клинических симптомов составляет 44 часа [1, 11, 53, 138].

Исследования генетического разнообразия и эволюционный анализ норовирусов являются неотъемлемой частью эпидемиологического надзора, отсутствие объективных данных о распределении генотипического профиля возбудителей НВИ в эндемичных регионах Российской Федерации представляет значительную проблему в организации неспецифических профилактических мероприятий, а также реализации собственно противоэпидемических мероприятий. В условиях методологической ограниченности культивирования норовирусов в настоящее время на существующих клеточных моделях и, как следствие, отсутствия стандартного источника высококонцентрированной вирусной РНК, критической задачей становится разработка унифицированных методов подготовки нативного клинического материала к секвенированию методом NGS. Создание данных стандартизированных протоколов построения NGS-библиотек представляет собой ключевое методологическое достижение, которое преодолевает основное техническое ограничение в области.

Для преодоления существующих трудностей в эпидемиологическом надзоре и совершенствования системы профилактики за норовирусной инфекцией требуется разработка комплексного подхода. Ключевым направлением в решении этой задачи становится внедрение системного мониторинга, который не только позволяет получать актуальные данные о циркулирующих норовирусах, но и создает основу для фундаментальных исследований. Эффективным подходом к определению генотипического профиля норовирусов является реализация рутинного молекулярно-генетического мониторинга возбудителей НВИ на

эндемичных территориях. Типирование нуклеотидных норовирусных последовательностей в биологических образцах позволит создать рабочую коллекцию кДНК для дальнейшего решения актуальных проблем в области фундаментальной биологии. Оптимизированные лабораторные протоколы, обеспечивающие увеличение концентрации и качества норовирусной РНК из нативных образцов, являются основой для получения репрезентативных полногеномных данных. Их применение позволяет проводить углубленный филогенетический, эволюционный и структурно-функциональный анализ вирусной популяции. Интеграция этого подхода с системой рутинного мониторинга консервативных участков генома формирует комплексную методологическую платформу для всестороннего изучения норовирусной популяции.

На данном этапе развития современных подходов к мониторингу инфекционных заболеваний практикуется изучение не только особенностей возбудителя, но и особенностей макроорганизма человека. По данным зарубежных исследователей существуют пути формирования генетически детерминированной невосприимчивости к норовирусам посредством однонуклеотидных полиморфизмов в организме человека (SNP – single nucleotide polymorphism). Человеческий ген FUT контролирует экспрессию антигенных детерминант (HBGAs), которые являются корецепторами, реализующими дальнейшую интернализацию вирусной частицы в клетку-мишень [142]. Согласно научным трудам только функционально активный ген FUT способен ферментировать комплекс HBGAs за счет гликозилирования белков альфа-1,2-фукозилтрансферазой 2. Наличие одного функционального аллеля в гене FUT2 приводит к потенциальному синтезу активного фермента альфа-1,2-фукозилтрансферазы 2, что обуславливает восприимчивость к норовирусу [131].

Таким образом, высокая глобальная распространенность норовирусной инфекции, ее значительное социально-экономическое бремя и изменчивая молекулярно-эпидемиологическая картина, характеризующаяся появлением новых геновариантов и рекомбинантных форм вируса, обуславливают настоятельную

потребность в совершенствовании системы эпидемиологического надзора. Преодоление существующих трудностей и прогнозирование эпидемической ситуации требуют комплексного подхода, основанного на углубленном изучении как возбудителя, так и макроорганизма.

Анализ актуальности темы исследования позволил поставить следующие цель и задачи диссертационной работы.

Цель исследования:

Изучение генетического разнообразия норовирусов на территории Свердловской области и проведение анализа распространенности однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT, ответственных за формирование генетически детерминированной резистентности к норовирусу.

Задачи работы:

- 1) Адаптировать алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов на территории Свердловской области, включающий формирование коллекции нуклеотидных последовательностей.
- 2) Охарактеризовать генетическое разнообразие норовирусов, идентифицированных в клинических образцах от больных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области в период 2022-2024 гг., на основе типирования нуклеотидных последовательностей с применением методов секвенирования по Сэнгеру и NGS.
- 3) Провести филогенетический анализ циркулирующих норовирусных генотипов с целью идентификации генетических кластеров и определения генетической дистанции у наиболее дивергентных нуклеотидных последовательностей.
- 4) Адаптировать и апробировать лабораторные протоколы для оценки распространенности однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах FUT, ассоциированных с устойчивостью к норовирусной инфекции, в выборке доноров-добровольцев в г. Екатеринбурге.

Научная новизна работы.

Впервые для субъекта Уральского федерального округа адаптирован и внедрён комплексный алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов, включающий определенную последовательность этапов: формирование выборки клинических образцов с подтвержденным диагнозом «норовирусный гастроэнтерит», выделение нуклеиновых кислот и обратную транскрипцию, амплификацию фрагмента ORF1/ORF2 с модифицированным температурным профилем, секвенирование по Сэнгеру, полногеномное секвенирование методом NGS, биоинформатическую обработку, статистический анализ и формирование коллекции нуклеотидных последовательностей с аннотированными эпидемиологическими метаданными, хранящимися в формате Excel.

Новизна предлагаемого алгоритма заключается в интеграции модифицированных протоколов амплификации для последующего секвенирования фрагмента норовирусного генома, а также в разработке оригинального протокола обогащения для NGS-секвенирования и схемы биоинформатической обработки, что обеспечивает воспроизводимость результатов и позволяет проводить идентификацию циркулирующих норовирусов.

Разработаны оригинальные высокоспецифичные протоколы подготовки NGS-библиотек на основе специально сконструированных панелей праймеров для полногеномного секвенирования норовирусов. Актуальность данной разработки обусловлена отсутствием чувствительной клеточной модели для культивирования разнообразных генотипов норовируса, что делает прямую амплификацию вирусной РНК из клинического материала единственным путём получения полноразмерных геномов. Протокол направлен на эффективную работу с исходно низкой концентрацией вирусной РНК и позволяют целенаправленно секвенировать полные геномы доминирующих в Свердловской области генотипов – GII.4[P16] и рекомбинантного GII.7[P7]. Данный подход обеспечивает преимущество в специфичности, полноте покрытия и эффективности по сравнению с

универсальными методами амплификации, особенно при работе со сложными клиническими образцами.

Впервые установлен и охарактеризован актуальный генотипический профиль норовирусов, циркулирующих на территории Свердловской области в 2022-2024 гг. Определены преобладающие и второстепенные генотипы, что позволило выявить особенности местной эпидемиологической ситуации, отличающиеся от общероссийских тенденций.

На основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей (фрагмента ORF1/ORF2 и полных геномов) впервые выявлены и охарактеризованы локальные генетические кластеры норовирусов на территории Свердловской области, а также подтверждена циркуляция редких и новых рекомбинантных форм вируса, что свидетельствует об активных процессах эволюции в регионе.

Методом молекулярного моделирования установлены ключевые структурно-функциональные аминокислотные замены в главном капсидном белке VP1 циркулирующих норовирусов. Показано, что выявленные замены потенциально влияют на антигенные свойства вируса и его связывание с полисахаридным комплексом HBGAs.

Впервые в практике российских исследований норовирусной инфекции апробирован подход к оценке популяционной изменчивости генов FUT (фукозилтрансфераз) у добровольцев в городе Екатеринбурге. Определён спектр однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1 и FUT2, ассоциированных с восприимчивостью к норовирусной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В результате исследования адаптирован и апробирован алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов. Адаптация протоколов амплификации и температурных профилей позволила обеспечить стабильное качество получаемых последовательностей. Систематизированная коллекция нуклеотидных последовательностей (в формате электронной таблицы с аннотированными эпидемиологическими метаданными) в сочетании с

депонированием полученных последовательностей в международную базу GenBank обеспечивает воспроизводимость филогенетического анализа и позволяет выявлять основные предикторы генетической изменчивости. Представленный подход обеспечивает обоснованный отбор наиболее дивергентных и эпидемиологически значимых генотипов для их углублённого изучения методом NGS. Апробированная на территории Свердловской области методология может быть рекомендована для применения в других регионах УрФО при организации молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Разработанные в ходе исследования протоколы подготовки геномных библиотек представляют собой стандартизированное решение, которое позволяет преодолеть основное техническое ограничение в изучении норовирусов – обеспечивать высококачественные данные секвенирования методом NGS из нативного клинического материала, что открывает возможности для полноценного филогенетического, эволюционного и структурно-функционального анализа вирусной популяции. Подготовленные лабораторные протоколы обладают высокой практической значимостью, особенно в условиях, когда культивирование норовирусов на стандартных клеточных моделях принципиально затруднительно и, как следствие, отсутствует источник высококонцентрированной вирусной РНК для исследований.

Получен уникальный массив первичных генетических данных о циркулирующих норовирусных генотипах (нуклеотидные последовательности фрагмента ORF1/ORF2 и полноразмерные геномы), который вносит вклад в фундаментальную вирусологию и эволюционную эпидемиологию. В частности, впервые описаны структурно значимые аминокислотные замены в антигенных детерминантах белка VP1 у GII.7[P7] и GII.4[P16], что расширяет знания о механизмах антигенной изменчивости норовируса и является важной предпосылкой для поиска новых мишеней при возможной разработке кандидатных поливалентных вакцин.

Выявлены локальные генетические кластеры норовирусов в Свердловской области и их эволюционные связи с последовательностями из международной базы

данных GenBank. Полученные данные позволяют прогнозировать риск активации эпидпроцесса при выявлении эмерджентных норовирусов, отслеживать их появление путём сравнения с локальными кластерами и информировать органы Роспотребнадзора, переходя к предиктивному надзору.

3D-моделирование позволило визуализировать аминокислотные замены в белке VP1. Определена их потенциальная роль в изменении антигенных свойств и связывания с клеточными рецепторами. Эти результаты расширяют представления о молекулярных детерминантах патогенности норовирусов.

Реализация рутинного генетического мониторинга популяционной изменчивости генов FUT позволит оценить многообразие генетического состава однонуклеотидных полиморфизмов в человеческой популяции, а также своевременно определять группы риска, наиболее подверженные инфицированию.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Адаптированный алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов, включающий модифицированный протокол амплификации фрагмента генома и разработанный протокол амплификации полного генома норовирусов для последующего секвенирования, обеспечил корректное типирование нуклеотидных последовательностей, что позволило идентифицировать генотипический профиль норовирусной популяции в субъекте УрФО.
2. Установлено преобладание норовирусов геногруппы GI над геногруппой GII с доминированием капсидных и полимеразных типов GII.4[P16], GII.17[P17], GII.7[P7], что подтверждено результатами молекулярно-генетического мониторинга. Для описанных генотипов в Свердловской области характерна высокая степень генетической идентичности при незначительном присутствии высокодивергентных генотипов, доля которых составляет 10% от всей популяции норовирусов.
3. Разработанный лабораторный протокол обогащения NGS-библиотек, основанный на оригинальной панели олигонуклеотидов, фланкирующих

полноразмерный геном норовируса, позволил успешно провести типирование генотипа GI.4[P16] и рекомбинантного GI.7[P7]. Для последнего показана ведущая роль межгенотипной рекомбинации в обеспечении генетического разнообразия доминирующих генотипов.

4. Комплексный подход, основанный на сочетании репрезентативной выборки, адаптированного протокола амплификации генов FUT1/FUT2, последующего секвенирования и биоинформатического анализа, позволил провести оценку популяционной изменчивости генов семейства FUT путём определения их SNP-профиля.

Личный вклад автора состоял в самостоятельном проведении обзора литературы; разработке дизайна и проведении экспериментов; интерпретации результатов (выполнено под руководством д.б.н. А.В. Семенова). Кроме того, автором лично выполнены: молекулярно-генетические исследования, разработка протоколов по обогащению полноразмерных геномов норовирусов, биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей норовирусов, филогенетический анализ, определение генетической дистанции между нуклеотидными/аминокислотными последовательностями, статистическая обработка данных и реконструкция 3D-моделей (под руководством д.б.н. А.В. Семенова и к.б.н. Т.М. Итани).

Степень достоверности и апробации результатов.

Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: IV Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (г. Санкт-Петербург, 2023); VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2023); X Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов «Open Bio» (Наукоград Кольцово, 2023); IX Российский Конгресс лабораторной медицины «Российский диагностический Саммит 2023» (г.

Москва, 2023); XVI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Екатеринбург, 2024); XVI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (г. Москва, 2024); Всероссийская научно-практическая конференция «Вирусные инфекции в 21 веке: вызовы и ответы», посвященную 105-летию создания ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора (г. Екатеринбург, 2025); Научная-практическая конференция «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и гигиены в Вооруженных Силах Российской Федерации» (г. Екатеринбург, 2025); V Конгресс молодых ученых (г. Сочи, Сириус, 2025).

По материалам диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, основные результаты изложены в 5 оригинальных статьях, из которых 3 опубликованы в рецензируемых журналах, входящих в Перечень Высшей аттестационной комиссии (ВАК), и 2 – в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и относящихся к первому квартилю (Q1). Промежуточные результаты и методологические аспекты были представлены в форме 7 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 188 страницах, включает 28 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 173 источника.

Работа выполнена при финансовой поддержке:

1) Государственное задание на тему «Мониторинг циркуляции и генетического разнообразия возбудителей норовирусной инфекции» (№ 123051100045-0).

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общая характеристика норовирусов: таксономическое положение, морфология и ультраструктура, стадии репликативного цикла, номенклатурные критерии, мутационная изменчивость

Согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses), норовирусы человека относятся к виду (*species*) *Norwalk virus*, роду (*genus*) *Norovirus*, семейству (*family*) *Caliciviridae* [90]. Норовирусная частица обладает сферической морфологией, не образует суперкапсида и имеет диаметр 38 нм [135, 163].

Вирион обладает капсидом с кубическим типом симметрии $T = 3$ (число триангуляций). Геном норовируса представляет собой линейную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности длиной 7,5-8,3 тыс. нуклеотидов (т.н.), которая на 5' конце связана с кодируемой вирусом молекулой белка VPg (virus protein, genome linked), а на 3' связана с poly (A) хвостом [104, 153]. Три открытые рамки считывания ORFs определяют синтез структурных и неструктурных вирусных белков, также геном норовируса содержит короткие нетранслируемые участки 5'UTR/3'UTR. ORF1 имеет длину более 5 тыс. п.н. и кодирует полипротеин молекулярной массой 200 килодальтон (кДа), который в дальнейшем при помощи вирусной протеазы (Pro, NS6) протеолитически расщепляется на 6 неструктурных белков NS (nonstructural proteins): p48 (белок гомологичный мышинному норовирусу NS1/2), нуклеозидтрифосфатаза NTPase (NS3), p22 (NS4), VPg (NS5), протеаза (Pro, NS6) и РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp, NS7). ORF2 содержит около 1,8 т.н. и кодирует главный капсидный белок VP1 (major viral protein) (Рисунок 1). Структурный белок VP1 условно делится на оболочечный S и выступающий P домены. Домен S формирует внутренний каркас капсида, а домен P – выступающие дугообразные выступы (субдомены P1 и P2).

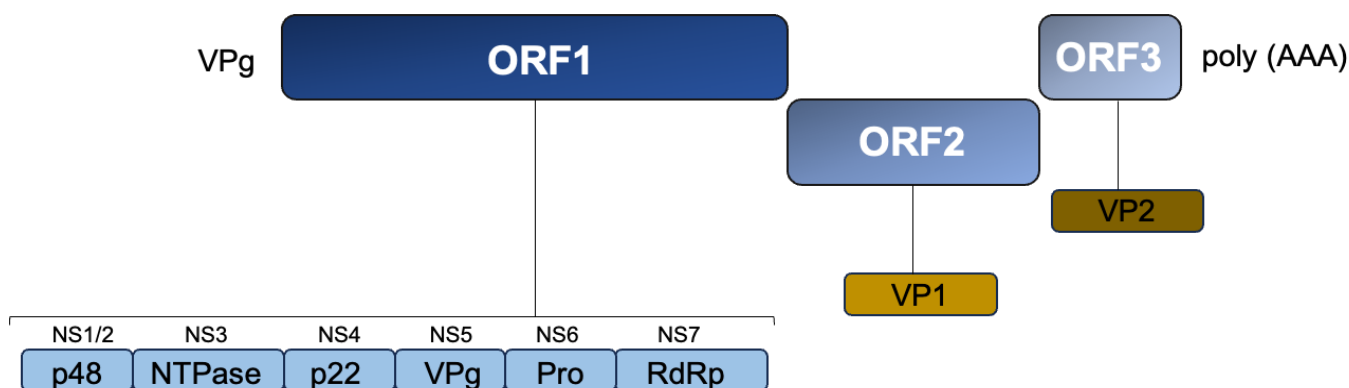


Рисунок 1. Генетическая структура норовируса

ORF3 имеет длину около 600 нуклеотидов и кодирует минорный белок VP2, который встраивается во внутреннюю поверхность вирусной частицы при помощи взаимодействия с доменом оболочки VP1 (Рисунок 2) [81]. P2 домен, находящийся на поверхности норовирусного вириона, является доминантной целью специфической гуморальной системы организма человека [128]. В структуре главного капсидного белка VP1 выделяют иммунологические эпитопы, которые обуславливают специфический адаптивный иммунный ответ при контакте с паратопом конкретного иммуноглобулина. Известно пять эпитопов А-Е [110]. Эпитопы А, D и Е относятся к блокирующим эпитопам, поскольку образованные в них мутации способны изменить конформацию белковой молекулы, что потенциально может привести к снижению аффинности активного центра иммуноглобулина к антигенной детерминанте вируса. Эпитоп А представляет собой конформационный эпитоп, который был определен как блокирующий эпитоп у нескольких штаммов GII.4 [50, 110]. Считается, что он является иммунодоминантным и, вероятно, состоит из нескольких перекрывающихся эпитопов [51, 111]. Мутационные вариации в пределах эпитопа D способны изменять сайт связывания с комплексом HBGAs [109]. Эпитоп Е первоначально был идентифицирован как эпитоп блокирующий штамм GII.4 Farmington Hills 2002. Ввиду недостаточной изученности роль эпитопов В и С в настоящее время является предметом дискуссии в научном сообществе.

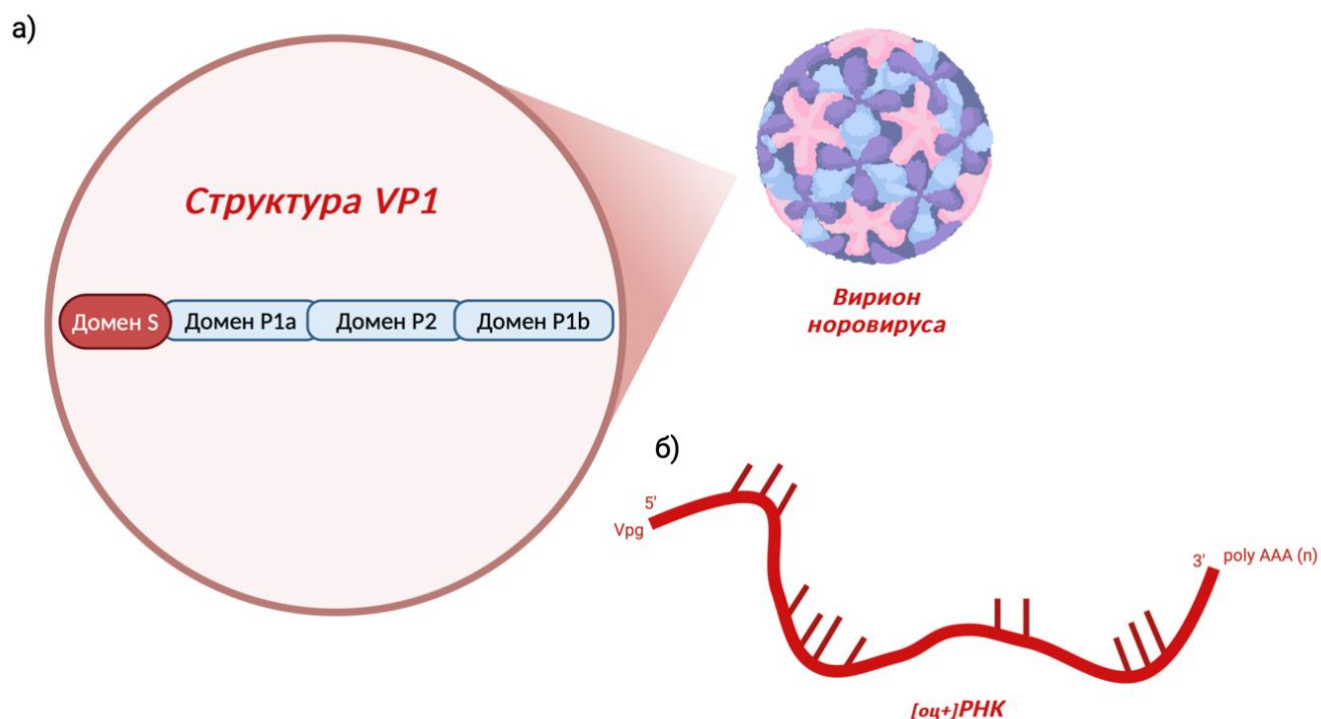


Рисунок 2. Морфология и ультраструктура норовируса (а – вирион норовируса, доменная структура главного капсидного белка – VP1; б – линейная одноцепочечная РНК положительной полярности. Иллюстрация создана при помощи BioRender software [30])

Репликативный цикл начинается с взаимодействия вириона с клеткой-мишенью посредством распознавания специфических клеточных рецепторов, кофакторов, обуславливающих интернализацию норовируса. Основным рецептором для норовируса человека до сих пор неизвестен. Однако были описаны некоторые корецепторы и факторы связывания с клеткой-мишенью, в том числе антигенные детерминанты HBGAs и желчные кислоты [118]. Субдомен P2 играет ключевую роль в пенетрации вирусной частицы в клетку хозяина, т.к. P2 является местом специфического взаимодействия с полисахаридным комплексом HBGAs [107]. Проникновение вируса в клетку осуществляется путем реализации рецепторного эндоцитоза. Известно, что норовирус может использовать разные способы эндоцитоза, например: клатрин-опосредованный эндоцитоз (рецепторный способ, предполагающий образование везикул размером 100 нм, временно окаймленных внутриклеточным белком клатрином), рафт-опосредованный эндоцитоз (липидный рафт – микродомен клеточной мембраны, обогащенный холестерином,

сфинголипидами и насыщенными фосфолипидами) После эндоцитоза при участии субдомена VP1 происходит интернализация вируса и последующая депротенизация вирусного капсида с высвобождением РНК в цитозоле клетки [13]. При высвобождении вирусной нуклеиновой кислоты из нуклеокапсида белок VPg, который ковалентно связан с 5' концом вирусного генома, взаимодействует с клеточными факторами инициации трансляции, такими как eIF3, образуя трансляционный комплекс [47]. Далее следует распознавание 40S субъединицей рибосом, что приводит к трансляции неструктурного полипротеина, который содержит неструктурные вирусные белки [47, 86]. После этапа синтеза полипротеина протеаза посттрансляционно расщепляет полипротеин, образуя три белка-перкурсора: p48/NTPase, p22/VPg и Pro/Pol [25, 26, 88]. Перкурсорный белок Pro/Pol обладает двумя ферментативными функциями: протеазной и полимеразной активностью. Впоследствии три белковых предшественника протеолитически расщепляются под действием комплекса Pro/Pol, который, в свою очередь, саморазрушается и образует шесть отдельных неструктурных белков [119, 120, 162]. Далее процесс репликации совершается за счет действия белков Pol, VPg и NTPase, где последний обладает тремя активностями: хеликазной, гидролазной и шапероновой [105, 132]. Позже синтез вирусного генома и субгеномов, связанных с белком VPg, задействует факторы инициации клеточной трансляции [47]. Таким образом, благодаря фолдинг активности NTPase белка происходит восстановление исходной конформации норовирусного генома [47, 146]. Вирусный полипротеин синтезируется в результате трансляции вирусного генома, а структурные белки VP1 и VP2 будут получены путем трансляции субгеномов [33]. Параллельно процессам репликации белок p48 мигрирует в эндоплазматический ретикулум и систему аппарата Гольджи [64], где индуцируется его разборка, вызывая интерференцию сигнальных путей NFκB, MAPK и PI3K-Akt, которые ответственны за формирование адаптивного иммунного ответа хозяина [64, 103]. Белок p48 связывается с мембранным белком А, который является составной частью комплекса VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A, мембранные белки, связанные с везикулами, протеином А), который принимает

участие в опосредованном визикулярном транспорте с белковыми группами комплекса SNARE (soluble NSF attachment receptor), вызывая блокаду клеточного транспорта белка [64, 140]. Кроме того, эффект, вызываемый р48, усиливается действием р22, который синергически способствует разрушению аппарата Гольджи [145]. Белки р22 и NTPase способствуют проапоптотической активности клетки, обуславливая высвобождение норовирусных вирионов из клетки-мишени [42].

Ранняя систематика норовирусов на уровне генотипов основывалась на анализе филогенетических взаимосвязей с использованием пороговых значений генетических дистанций аминокислотных последовательностей белка VP1, позволявших относить вновь выявленные последовательности к существующим или новым генотипам [170]. С 2019 года авторский коллектив под руководством П. Чабра пересмотрел классификацию норовирусов и внес существенные доработки в схему классифицирования. Обновленная схема классификации норовирусов демонстрирует подход количественного определения геногрупп и генотипов, основанный на результатах секвенирования полной аминокислотной последовательности VP1, а также идентификации Р-групп и Р-типов путем секвенирования фрагмента РНК-зависимой РНК-полимеразы на 5'конце ORF1 [44].

Примечательно, что штаммы GI.4, обладающие эпидемическим потенциалом, не сразу вызывали глобальные эпидемии, а первоначально ограничивались локальными случаями заболеваемости в разных городах и странах. К примеру, норовирусные штаммы New Orleans 2009 и Sydney 2012 циркулировали в человеческой популяции около двух лет, прежде чем приобрели способность индуцировать масштабные вспышки групповой заболеваемости. В частности, доэпидемический штамм норовируса Sydney 2012 был выявлен в Новой Зеландии в 2010 году, а также в Канаде и Италии в 2011 году [57, 59, 75, 82]. Однако выделенные штаммы были связаны с локальными вспышками и не имели глобальной распространенности. Анализ эволюционных событий в ключевых антигенных эпитопах А-Е домена VP1 штамма Sydney 2012 продемонстрировал,

что потребовалось несколько мутационных замен, прежде чем доэпидемическая форма приобрела пандемический потенциал. Это свидетельствует о том, что эмерджентные варианты GII.4 способны длительное время циркулировать в человеческой популяции до момента накопления несинонимичных мутаций в домене VP1, способствующих уклонению от коллективного иммунитета. Именно подобные мутации обладают прогностической ценностью, поскольку недавно появившиеся варианты GII.4 возможно отслеживать и выявлять задолго до того, как они эволюционируют в новые геноварианты, способные уклоняться от иммунного ответа. Разработка подходов к выявлению и анализу таких мутаций важна для прогнозирования появления новых пандемически значимых генетических вариантов возбудителей.

Эволюционные процессы в линии GII.4 обусловлены рядом механизмов [36]. Считается, что норовирусы генотипа GII.4 способны связываться с более разнообразным спектром изоформ антигенных детерминант HBGA, являющихся кофактором прикрепления вируса к клетке-мишени, по сравнению с норовирусами других генотипов, и поэтому имеют больше возможностей для закрепления в восприимчивой человеческой популяции [49, 144]. Кроме того, более высокая эпидемиологическая приспособленность норовирусной линии GII.4 может быть результатом повышенной скорости накопления и закрепления мутаций в последующих поколениях, что представляет собой эволюционное преимущество перед другими норовирусными генотипами [34].

Антигенный дрейф является важным эволюционным фактором, способствующим появлению новых геновариантов норовирусов. Наибольшая генетическая вариабельность наблюдается между различными вариантами GII.4 в блокирующих эпитопах (А-Е) домена Р2 главного капсидного белка VP1 [109, 147]. Эпитоп А является наиболее важным фактором, определяющим антигенную изменчивость, за счет преобразования полипептидной структуры домена Р2, что подтверждается в экспериментах с отсутствием реакции нейтрализации в парных сыворотках. Благодаря быстрому накоплению точечных мутаций в других эпитопах VP1 направленный эволюционный процесс способен формировать новые

антигенные варианты генотипа GII.4 [14, 34, 112]. На протяжении длительного времени домен Р2 подвергается селективному давлению, были выявлены новые множественные мутационные замены в четырех аминокислотных позициях домена Р2 (294, 368, 373 и 376), которые подверглись положительному отбору. Представленные мутации в аминокислотных последовательностях (294 и 368) соответствуют эпитопу А, аминокислотная позиция 376 находится в эпитопе С, позиция 373 не связана с эпитопом С. Таким образом, возможно предположить, что подобные комплексные адаптивные изменения в полипептидной цепи Р2 способствовали появлению штамма Sydney 2012. В исследованиях К. Деббинка экспериментально продемонстрировано отсутствие нейтрализующей реакции с использованием как моноклональных антител, так и поликлональных сывороток к новому штамму Sydney 2012, что в очередной раз доказывает приобретение штаммом Sydney 2012 новых антигенных свойств [51]. Необходимо подчеркнуть важность мутационных замен в позициях 294 и 368 эпитопа А, т.к. именно они определяют антигенную специфичность штамма GII.4 Sydney 2012 [51].

Рекомбинационная изменчивость служит ключевым механизмом эволюции РНК-содержащих вирусов, приводя к значительным структурным перестройкам их генома и созданию новых генетических вариантов. Процессы рекомбинации играют ключевую роль в предотвращении гуморального ответа, направленного на элиминацию неструктурных белков норовируса. Большая часть межгенотипной и внутригенотипной рекомбинационной изменчивости норовирусного генома происходит в участке перекрытия ORF1-ORF2, который, как известно, является местом инициации транскрипции геномной РНК [33, 35]. Вторичный участок, где обычно происходит рекомбинация располагается в ORF2 [58].

Важно отметить, что многие современные норовирусы, отличные от GII.4, являются рекомбинантными, такими как GII.Pb/GII.3, GII.Pb/GII.13, GII.Pg/GII.12, GII.P4/GII.10, GII.P6/GII.14 и GII.P16/GII.2. Исследование генотипического профиля, проведенное в Сингапуре, выявило закономерное распределение норовирусных генотипов, в котором из всей выборки только генотипы GII.6, GII.4 и GII.7 были нерекомбинантными вирусами дикого типа [106]. GII.Pb/GII.3 являлся

причиной нескольких сотен вспышек норовирусного гастроэнтерита в странах Европы в 2000-2001 гг. [19, 72], а также последующих вспышек в Австралии и Азии [133, 166]. Норовирусный рекомбинант GII.Pb/GII.3 характеризуется высокой циркуляцией в детской популяции [117]. С момента его первоначальной идентификации полимеразный ген GII.Pb претерпел значительный эволюционный путь, в процессе рекомбинации с генами капсидного белка VP1, принадлежащими как минимум пяти различным генотипам: GII.1, GII.2, GII.3, GII.4 и GII.13 [106, 137]. Способность к частой рекомбинации является ключевым механизмом, определяющим динамику и смену доминирующих генотипов на эндемичных территориях.

Ярким примером такой динамики служит появление и распространение рекомбинанта GII.P16/GII.2. Идентифицированный в 2010 году, данный геновариант быстро нарастил эпидемиологический потенциал и в последних исследованиях демонстрирует более высокий удельный вес в генотипическом профиле норовирусов [106]. События рекомбинации в генотипе GII.4 влияют на появление широкого спектра новых геновариантов, включая два известных штамма: New Orleans 2009 и Sydney 2012. В общей сложности за время длительного изучения GII.4 было обнаружено около 11 потенциальных случаев рекомбинации, и девять из них находились в области соединения ORF1-ORF2 [58]. Из 12 клинических образцов с выявленными штаммами GII.4, датированных 1996 годом, у половины были обнаружены признаки рекомбинации. Установлено, что регион ORF1, кодирующий неструктурные белки, является следствием рекомбинационной изменчивости штамма Osaka 2007 (GPe/GII.4), в то время как область ORF2-ORF3 связана со штаммом Apeldoorn 2008 (GII.4). Оба предковых геноварианта GII.4 вызывали подъемы заболеваемости, но не были связаны с широкомасштабными пандемиями норовирусного гастроэнтерита. Однако рекомбинация между представленными генетическими линиями генотипа GII.4 в конечном итоге привела к появлению пандемически значимого штамма, продемонстрировав важность рекомбинации как движущей силы эволюции [58].

2.2 Генетическое разнообразие возбудителей НВИ.

2.2.1 Мировые тенденции распределения норовирусных генотипов

После успешного внедрения поливалентной вакцины против другого распространенного возбудителя кишечной инфекции (RotaTeq – поливалентная вакцина против ротавирусной инфекции, содержащая активный компонент против четырех серотипов) норовирусы стали основной причиной вирусного гастроэнтерита в США и других развитых странах [130]. Одним из основных препятствий на пути разработки эффективной вакцины является обширное генетическое и антигенное разнообразие норовирусов. Как было описано выше, различные геноварианты GII.4 преобладали человеческой популяции на протяжении 20 лет, при этом новые генотипы последовательно сменяли лидирующий GII.4. Примером последовательной смены циркулирующих штаммов GII.4 является большое количество вспышек, зарегистрированных в период 2014-2017 гг., связанных с вирусами GII.17 и GII.2 [20, 91]. В странах Японии и Китая эмерджентный GII.17[P17] полностью вытеснил штамм Sydney 2012, что ознаменовало, по мнению исследователей, окончание «эры GII.4» [48]. Появлению новых преобладающих вариантов норовируса способствуют, как известно, мутационные изменения в VP1, что позволяет норовирусам избегать адаптивного иммунного ответа, сформированного против предшествующих штаммов [129].

Однако в последнее время наблюдается смена парадигмы в отношении частоты рекомбинации главного капсидного белка. Все больше исследований демонстрируют преобладание норовирусов, связанных с событиями рекомбинации в области неструктурных белков. Примечательно, что появление нового геноварианта ORF1 GII.P16 было взаимосвязано с циркуляцией нескольких новых рекомбинантных штаммов, которые регистрировались по всему миру (например, GII.4[P16], GII.2[P16], GII.12[P16]) [123, 126, 173]. Благодаря доступности биоинформатического анализа можно утвердительно заявить о теоретической возможности формирования 1200 различных типов рекомбинаций капсида и

полимеразы, масштабные исследования полного генома показали, что лишь часть этих комбинаций жизнеспособна и сохраняется в вирусной популяции [156].

В актуальном исследовании Ж. Кендра и др. был проанализирован архив всех депонированных нуклеотидных последовательностей норовирусов человека за 1995-2019 гг., где общая выборка изученных последовательностей составила $n = 30\,810$ [95]. Анализу подверглись различные участки норовирусного генома, кодирующие как отдельно ген полимеразы, так и ген капсида. Также для упорядочивания большого массива данных формировали категории, по которым последовательности соотносились по участку типирования, длине и территориальной принадлежности. Благодаря систематизации полученных данных в RStudio выяснилось, что в группу наиболее распространенных норовирусных генотипов, циркулирующих ежегодно, входил по крайней мере один из геновариантов GII.4. За аналитический период 1995-2019 гг. GII.4 был преобладающим генотипом, определяемым по VP1-типированию, на который приходилось 52,6 % всех доступных последовательностей в базах данных Noronet и GenBank. Вторым по распространенности генотипом был GII.3 (11,5 %), за ним следовали GII.2, GII.17, GII.6, GI.3, GII.13, GI.4, GII.12 и GII.14. Остальные капсидные генотипы составляли всего 8,4 % от общего числа всех проанализированных последовательностей.

Анализ ежегодной циркуляции капсидных генотипов продемонстрировал постоянное присутствие GII.4, на долю которого в определенные годы приходилось около 60 % всех депонированных последовательностей. Генотип GII.3 также регистрировался во все годы наблюдений с постоянной частотой (в диапазоне 3,9-25,0 %, в среднем 11,7 %). Наблюдалось значительное снижение удельного веса GII.2 и GII.17 (1,0-7,5 % и 0,0-6,0 % соответственно), но за последние шесть лет распространенность обоих генотипов заметно возросла, причем в 2017 году GII.2 стал преобладающим генотипом, на который пришлось 47,9 % всех зарегистрированных последовательностей, а GII.17 в 2015 году стал новым лидирующим генотипом в странах Китая и Японии.

Учитывая сохраняющееся преобладание GII.4 и его выраженную вирусную диверсификацию, была проделана работа по анализу временного распределения генетических вариантов [149, 167]. Биоинформатический анализ пула последовательностей GII.4 за период 1995-2019 гг. продемонстрировал хронологическое появление и вытеснение геновариантов, о которых ранее сообщалось в исследованиях, при этом пандемически значимый штамм Sydney 2012 преобладал в течение более длительного периода, чем любой из его предшественников [155]. Важно отметить, что некоторому количеству последовательностей GII.4 не удалось присвоить новый вариант по причине наличия коротких нуклеотидных последовательностей (100-300 п.н.) и анализа высококонсервативных участков капсида, которые не давали объективного филогенетического сигнала для идентификации потенциально новых геновариантов.

Количественный анализ 56 уникальных Р-типов показал доминирование полимеразы GII.P4 (28,5 %), за которой следовали GII.P16 (16,3 %) и GII.P31 (12,1 %). Анализ глобального распределения генотипов подтвердил устойчивое преобладание капсидного генотипа GII.4 во всех регионах, за исключением Южной Азии. С 2015 года наблюдается значительная динамика, подтверждающая быстрым распространением генотипов GII.17 и GII.2, а также сменой доминирования среди Р-типов полимеразы с GII.P4 на GII.P31 и GII.P16, что подчеркивает важность типирования двух участков генома для выявления рекомбинантных событий и появления новых генотипов.

2.2.2 Генотипический профиль возбудителей НВИ на территории Российской Федерации

Молекулярно-генетический мониторинг спектра циркулирующих норовирусных штаммов проводится в большом количестве субъектов Российской Федерации, охватывая все генетическое многообразие возбудителей НВИ. По итогам работы референс-центра на базе ФБУН «Центральный НИИ

эпидемиологии» Роспотребнадзора ежегодно предоставляются данные о генетическом разнообразии норовирусов, выявленных на эндемичных территориях. Систематизация данных генотипического профиля норовирусов в различных субъектах РФ позволила выявить уникальное распределение норовирусных штаммов, во многом отличающееся от результатов, полученных в других странах.

Исследование распространенности норовирусных генотипов в Новосибирске за анализируемый период 2003-2012 гг. демонстрирует доминирующее положение второй генетической группы [172]. При проведении генетического анализа биологических образцов от детей с подтвержденной НВИ было обнаружено, что капсидный генотип GII.3 является наиболее распространенным в семи сезонах из десяти исследованных. В последующие аналитические периоды также определялся рекомбинантный вариант, включающий полимеразный тип GII.3[P21], что коррелировало с данными, полученными в других странах [116]. В 2011 году на смену, доминирующему GII.3[P21] пришел новый рекомбинантный геновариант GII.3[P12]. Важно отметить, что на момент проведенного исследования несколько идентифицированных капсидных вариантов GII.3 не входили ни в одну из ранее выявленных генетических линий, образуя изолированный кластер при проведении филогенетического анализа.

В отношении других выявленных генотипов было установлено, что в Новосибирске последовательно циркулировали семь различных штаммов GII.4[P4]. Примечательно, что периоды циркуляции новосибирских GII.4 частично совпадали с общемировой тенденцией. Например, штамм GII.4[P4] Den Haag 2006b и штамм GII.4[P4] New Orleans 2009 циркулировали дольше всего – в период 2006-2010 гг. и 2009-2012 гг. соответственно. Эпидемический штамм GII.4[P4] Yerseke 2006a являлся причиной множества вспышек групповой заболеваемости в Европе, США, Новой Зеландии и Австралии, но не обладал широким распространением в Новосибирске [148]. Вопреки повсеместному распространению GII.4 Sydney 2012 во всем мире на территории Новосибирска было обнаружено только два геноварианта GII.4 Sydney 2012, относящиеся к разным типам полимеразы: GII.P4,

ГII.Ре. К тому же на территории Новосибирска были обнаружены впервые описанные генетические варианты норовирусов, которые ранее не встречались в России. Выявленный генотипический профиль был представлен: ГII[Pg], ГII.6[P7], ГII.7[P7], ГII.5[P16], ГII.16[P16], ГII.2[P21], ГII.21[P21]. Анализ опубликованных данных в очередной раз подчеркивает индивидуальность генетического разнообразия возбудителей НВИ, встречающегося на территории РФ.

Другое исследование, проведенное в азиатской части России, продемонстрировало сопоставимое генетическое разнообразие выявленных норовирусных генотипов с распределением, полученным на территории города Новосибирска. Генетический анализ последовательностей выявил циркуляцию восьми капсидных генотипов с преобладанием ГII.3, за которым следовали ГII.4, ГII.6 и ГII.1. Обнаруженные генотипы ГII.7, ГII.2, ГII.4, ГII.16 составляли меньшую часть в генотипическом профиле норовирусов. В структуре Р-типов наибольший удельный вес приходился на ГII.P21, ГII.P4, ГII.P7 и ГII.Pg [171].

Исследование, посвященное молекулярно-генетической характеристике норовирусов в Омской области в период 2009-2011 гг., демонстрирует идентичное распределение норовирусных генотипов, описанное в других городах России. Норовирусы в большем объеме представлены схожим распределением генотипов, за исключением ГII.4, на который приходилась большая часть зарегистрированных случаев болезни. За ГII.4 следовали ГII.3, ГII.6, ГII.8, ГII.12 [16].

При анализе генетического разнообразия на территории Амурской области (2022-2024 гг.) в очагах групповой заболеваемости наибольший удельный вес регистрировался в группе идентифицированных норовирусов, относящихся к геногруппе ГII. Генотипический профиль норовирусов преимущественно представлен наиболее распространенными капсидными и полимеразными типами: ГII.4[P16], ГII.17[P17], ГII.7[P7] [15, 143].

Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей НВИ за аналитический период 2015-2018 гг. на территории Хабаровского края демонстрирует преобладание генотипов ГII.4, ГII.6, ГII.17, ГII.3 в общей структуре заболеваемости [2, 3]. Обнаруженное распределение капсидных и

полимеразных типов на территории отдельных субъектов Российской Федерации подтверждает динамичность и изменчивость генотипического профиля норовирусов.

Обнаруженные на территории Нижнего Новгорода норовирусные генотипы характеризуются высоким генетическим разнообразием и представлены такими капсидными типами, как GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.12, а также GII.17[P17], который является доминирующим на территории Российской Федерации [7, 8, 62, 63]. Кроме того, были зарегистрированы случаи выявления рекомбинантного генотипа GII.12, который также обнаруживался на территории других стран [10].

2.2.3 Эпидемиологическая характеристика НВИ на территории Свердловской области

В Российской Федерации сохраняется неблагоприятная тенденция к росту заболеваемости норовирусной инфекцией, которая занимает ведущее место в структуре ОКИ установленной этиологии. По итогам 2024 года показатель заболеваемости достиг (37,62 на 100 тыс.) населения, что на 9% превысило уровень предыдущего года и в 1,8 раза – средний многолетний показатель (СМП). Удельный вес НВИ среди ОКИ установленной этиологии составляет 21,9%, демонстрируя устойчивый рост. Рост заболеваемости связан как с эволюцией вируса (смена циркулирующего генотипа с GII.17[P17] на GII.7[P7]), так и с большим охватом молекулярно-генетическими методами диагностики [6].

Важной эпидемиологической особенностью является крайне неравномерное территориальное распределение заболеваемости НВИ по субъектам РФ, что в значительной степени отражает различия в уровне и качестве лабораторного мониторинга. В перечне регионов с наиболее высокими показателями традиционно выделяется Свердловская область, которая в 2024 году заняла четвертое место в стране. Показатель заболеваемости НВИ в области (126,38 на 100 тыс. населения) в разы превышает среднероссийский и свидетельствует о непрерывном росте, что подтверждает напряженность эпидемиологической ситуации в регионе. Выбор

Свердловской области для настоящего исследования является научно обоснованным и определяется комплексом следующих взаимосвязанных факторов. Свердловская область входит в перечень субъектов РФ с высокими показателями заболеваемости НВИ, что свидетельствует об интенсивной циркуляции норовируса. Стабильно высокий уровень заболеваемости гарантирует формирование репрезентативной и достаточной по объёму выборки клинического материала, являющейся обязательным условием для проведения достоверного филогенетического анализа вирусной популяции [6].

Несмотря на неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию, на территории Свердловской области до настоящего времени не проводились систематические исследования по молекулярно-генетическому мониторингу норовирусов. В результате полностью отсутствуют научные данные о спектре циркулирующих норовирусов, их динамике и филетических связях, что не позволяет объективно оценивать движущие факторы эпидемического процесса в регионе. Результаты исследования позволят объективно оценить истинные масштабы и структуру циркуляции норовирусов, внедрить инструмент для оперативного молекулярно-эпидемиологического анализа эпидемического процесса, повысить эффективность противоэпидемических мероприятий за счёт идентификации источников и путей передачи, создать основу для прогнозирования эволюционных тенденций на основе данных о доминирующих и эмерджентных норовирусов.

Таким образом, проведение первого в Свердловской области комплексного эволюционного и структурно-функционального анализа вирусной популяции норовирусов является научно обоснованным и актуальным как для фундаментальной вирусологии, так и для практического здравоохранения региона. Исследование позволит не только охарактеризовать генетическое разнообразие патогена в условиях активной циркуляции, но и оценить его влияние на эпидемический процесс, что является важным шагом к совершенствованию системы мониторинга и контроля норовирусной инфекции.

2.2.4 Влияние однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT на генетически детерминированную восприимчивость к возбудителю НВИ

Оценка биологических маркеров восприимчивости к возбудителям инфекционных заболеваний играет важную роль в создании комплекса мероприятий, направленных на своевременное выявление групп риска, которые больше всего подвержены инфицированию, что в дальнейшем позволит более эффективно проводить неспецифические профилактические мероприятия в человеческой популяции. С момента открытия генов FUT в качестве основных генетических маркеров восприимчивости к различным возбудителям инфекционных болезней было проведено множество исследований, посвященных анализу мутационных замен в генах FUT1/2, способствующих формированию резистентности к норовирусам [108]. Нормальный полиморфизм группы генов FUT является причиной формирования генетически детерминированной резистентности к возбудителю НВИ. Контролируемая геном FUT2 экспрессия антигенных детерминант НВGAs, являющихся основным фактором связывания норовируса с клеткой-мишенью, обуславливает резистентность реактивного организма человека к норовирусу [87]. Полиморфизмы генов семейства FUT приводят к формированию нулевых аллелей, транскрипция которых приводит к снижению функционально активности белка или его отсутствию. Наличие нефункциональной фукозилтрансферазы, кодируемой генами FUT, приводит к снижению количества экспрессии НВGAs, что в конечном итоге способствует частичной или полной невосприимчивости к некоторым геногруппам/генотипам норовируса, обуславливая генотипическую специфичность. Этот механизм является причиной того, что около 20 процентов людей не способны экспрессировать НВGAs на поверхности слизистой оболочки энтероцитов, слюне и в других жидкостях организма (Рисунок 3) [66]. Мутации в генах FUT1/FUT2 нарушают синтез Н-антигена. Нефункциональный статус FUT2 достигается преимущественно нонсенс-мутациями, образующими стоп-кодон [164].

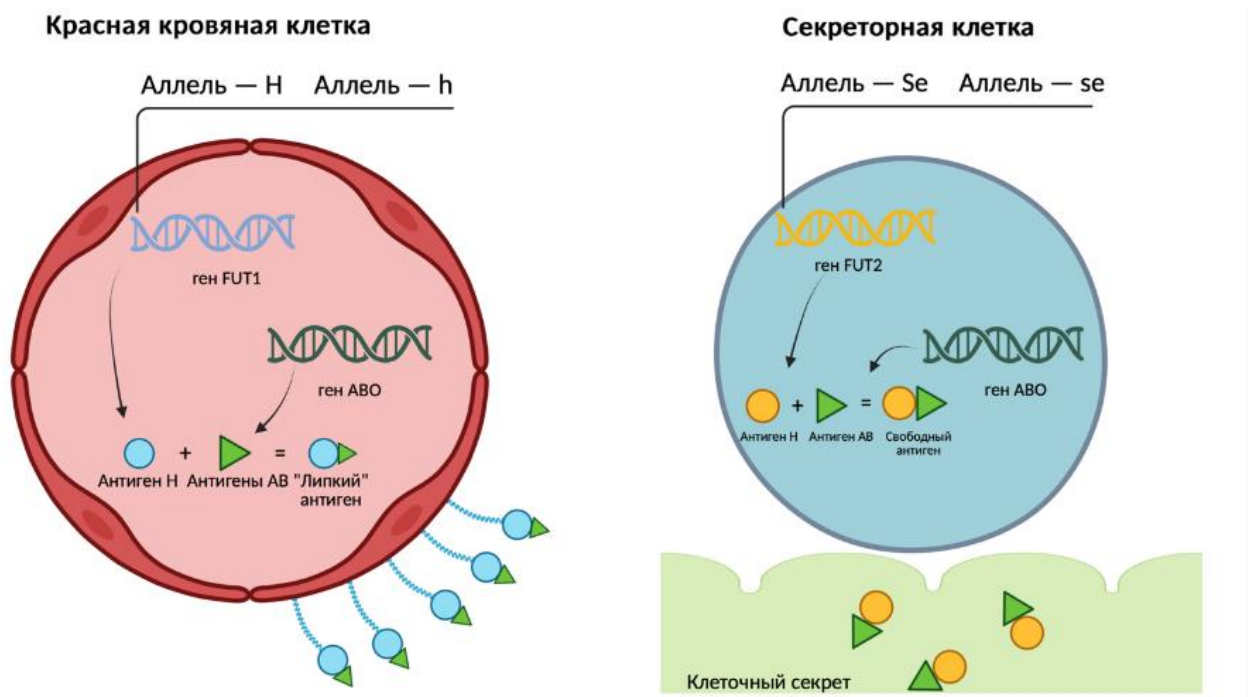


Рисунок 3. Регуляция синтеза и секреции генами FUT1/2 основных антигенов групп крови, входящих в состав комплекса HBGAs (Иллюстрация создана при помощи BioRender software).

Нонсенс-мутация с.428A>T (Trp; стоп-кодон в 143 аминокислотной позиции) является очень распространенным несекреторным аллелем у представителей европеоидной расы [154]. В работе Киндберг Е. и др. продемонстрировано, что восприимчивость к возбудителю НВИ имеет корреляционную связь с экспрессией антигенов HBGAs и функционально активным геном FUT2 [96]. Изучение восприимчивости к норовирусной инфекции было получено в результате исследований случаев групповой заболеваемости, вызванных отдельными генотипами норовируса. Подобные исследования проводились в Дании, Швеции, Нидерландах, Испании. Стало известно, что люди с секреторно-отрицательным статусом защищены от инфицирования норовирусами генотипа GI.4 [151]. Кроме того, исследования нескольких вспышек, где был обнаружен генотип GI.3, который также является одним из наиболее распространенных генотипов норовирусов, дали противоречивые результаты. В одном случае результаты исследования показали, что люди с отрицательно-секреторным статусом менее восприимчивы к инфекции, в то время как в другом – не было выявлено прямой зависимости между секреторным статусом и восприимчивостью к норовирусу

[157]. Современный тренд развития исследований, связанных с тканеспецифичной экспрессией генов семейства FUT, направлен на выявление взаимосвязи секреторной функциональности аллелей с развитием полигенных заболеваний не только инфекционной этиологии, таких как астма, пневмонии, сахарный диабет 1 типа [17, 76]. Разнообразие научных направлений поиска ассоциаций тканеспецифичной экспрессии генов семейства FUT с заболеваниями различной этиологии в настоящее время слишком велико, что предоставляет возможность впервые провести в Российской Федерации научную работу по изучению влияния генов FUT на восприимчивость к норовирусу, а также создать методики анализа полиморфизмов семейства FUT, что откроет перспективы понимания возникновения естественной резистентности организма.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Реактивы и материалы

В ходе исследования использовались: Фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (ФСБ), набор для выделения нуклеиновых кислот «РИБО-преп», набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L», вода деионизированная, для проведения реакции ПЦР использовались 5X ScreenMix-NS, олигонуклеотидные праймеры (синтезированные в «ДНК-Синтез»), для проведения гель-электрофореза применяли агарозу, бромистый этидий, ДНК-маркер, 10X TBE-буфер, наборы для очистки ДНК «Cleanup», для постановки реакции терминации использовался набор реагентов BrilliantDye «NimaGen», очистка прореагировавших дидезоксинуклеотиды проводилась при помощи набора реагентов «iX-Pure», для осуществления электрофореза в капиллярном генетическом анализаторе использовали 10X буфер с ЭДТА, полимер POP-7.

Каталожные номера используемых реактивов:

1. Фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (Производство ООО НПП «ПанЭко» в РФ), кат. № P009п;
2. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп[®]» (Производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в РФ), кат. № K2-9-Et-100. Состав комплекта:
3. раствор для лизиса, кат. № 1258, раствор для преципитации, кат. № 919, раствор для отмывки 3, кат. № 4299, раствор для отмывки 4, кат. № 4306, РНК-буфер, кат. № 932;
4. IMPROMINI для гематологических исследований с наполнителем ЭДТА К3, объёмом 0,2 мл, размером 10x45 мм и без капилляра (Производство Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, в Китае, кат. № 12006200);
5. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L[®]» (Производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в РФ), кат. №

- КЗ-4-100. Состав комплекта: RT-mix, кат. № 4755, RT-G-mix-1, кат. № 4714, ДНК-буфер, кат. № 4737, Ревертаза (MMLV), кат. № 4732;
6. 5X-окрашенная реакционная смесь для ПЦР «5X-ScreenMix-HS» (Производство Евроген в РФ), кат. № #PK143L;
 7. Вода деионизированная (Производство ООО НПП «ПанЭуо» в РФ), кат. № P009п;
 8. Агароза для электрофоретического разделения (Agarose special, Low EEO For Molecular Biology; Производство HIMEDIA в Индии), кат. № MB002-100G;
 9. 10X TBE-буфер для проведения электрофореза (10XTBEUsed in various Molecular Biology Applications; Производство HIMEDIA в Индии), кат. № ML011-500ML;
 10. Очистка кДНК из агарозного геля Cleanup Standard (Производство Евроген в РФ), кат. № #BC022S;
 11. ДНК маркер Step100 (Производство Biolabmix® в РФ), кат. № S-8100;
 12. Бромистый этидий, 10 мг/мл (Производство Biolabmix® в РФ), кат. № EtBr-10;
 13. Комплект для секвенирования методом Сэнгера Brilliant Dye™ Terminator (v1.1) (BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing Kit. Производство NimaGen в Нидерландах), кат. № BRD3-100. Состав комплекта: BrilliantDye, кат. № BRD3-100, 5X buffer for sequencing, кат. № BRB-2000;
 14. Очистка продуктов терминации iX-Pure (Производство NimaGen в Нидерландах), кат. № IXP-100. Состав комплекта: activator iX-Pure, кат. № IXP-100A, iX-Pure Resin, кат. № A089A00231;
 15. 10X Буфер с ЭДТА для проведения капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе (3730 Buffer (10X) with EDTA; Производство Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific в США), кат. № 4335613;
 16. Полимер POP-7 для проведения капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе (POP-7™ Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers; Производство Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific в США), кат. № 433224;

17. Планшеты 96-луночные для секвенирования (MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate; Производство Applied Biosystems by life technologies), кат. № N8010560.
18. БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0,2 до 30 т.п.н. с «горячим» стартом (Производство «Биолабмикс» в России), кат. № MN040-100. Состав комплекта: содержит 2× реакционную смесь БиоМастер LR HS-ПЦР (2×), ДМСО, стерильную воду и буфер для нанесения (6×) на гель;
19. БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×) для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (Производство «Биолабмикс» в России), кат. № RM05-40. Состав комплекта: 2× буфер для ОТ-ПЦР-Премиум, смесь ферментов БиоМастер Премиум-микс, вода, обработанная ДЭПК, ДМСО и буфер для нанесения (6×). В состав БиоМастер Премиум-микс входят M-MuLV-RN, HS-Taq ДНК-полимераза и Pfu ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций;
20. Обратная транскриптаза RNAscribe RT для проведения обратной транскрипции (Производство «Биолабмикс» в России), кат. № R04-10. Состав комплекта: генетически модифицированная обратная транскриптаза (M-MuLV), 5× ОТ-буфер-mix;
21. FTP Display (96) набор реагентов FTP Display для ферментативной фрагментации ДНК на 96 реакций (Производство «Биолинк» в России), кат. № 20096. Состав комплекта: неспецифическая ДНКаза I, термостабильная SD ДНК-полимераза;
22. ADP Display (96) набор адаптеров ADP Display для подготовки NGS библиотек на 384 реакции (Производство «Биолинк» в России), кат. № 30096. Состав комплекта: уникальные последовательности (индексы);
23. LIB Display (96) набор реагентов LIB Display для подготовки NGS библиотек для платформы Illumina на 96 реакций (Производство «Биолинк» в России), кат. № 40096;

24. VAHNS DNA Clean Beads магнитные частицы для очистки продуктов реакции амплификации (Производство Vazyme в Китае), кат. № #N411. Состав комплекта: 3 основных компонента – N411-01, N411-02, N411-03;
25. Qubit™ dsDNA HS Assay Kit набор для количественного определения ДНК (Производство Thermo Fisher Scientific в США), кат. № Q32851. Состав комплекта: реагент для подготовки образцов (компонент А) (объём – 1,25 мл), буфер для подготовки образцов (компонент В) (объём – 250 мл), стандарт 1 (компонент С) (концентрация – 0 нг/мкл, объём – 5 мл), стандарт 2 (компонент D) (концентрация – 10 нг/мкл, объём – 5 мл);
26. Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (300-cycle) набор реагентов для секвенирования (Производство MiSeq Illumina в США), кат. № MS-102-3003. Состав комплекта: буфер для разведения библиотек (Library Dilution Buffer) (4,5 мл/пробирка), картридж MiSeq™ Dx SBS v3 (MiSeq™ Dx SBS Cartridge v3), буфер MiSeq™ Dx SBS (PR2) (MiSeq™ Dx SBS Solution (PR2)) (500 мл/флакон), ячейка проточная MiSeq™ Dx (MiSeq™ Dx Flow Cell).

3.2 Алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов

Молекулярно-генетический мониторинг норовирусов на территории Свердловской области проводили в соответствии с адаптированным алгоритмом (Рисунок 4), включающим следующие этапы:

1. Формирование репрезентативной выборки – отбор нативного фекального материала от пациентов с подтверждённым диагнозом «норовирусный гастроэнтерит» (МКБ-10: A08.1) в медицинских организациях Свердловской области в период 2022-2024 гг. с соблюдением критериев включения/исключения.
2. Выделение нуклеиновых кислот и обратная транскрипция – экстракцию вирусной РНК из фекальных образцов для последующего секвенирования фрагмента ORF1/ORF2 проводили с использованием набора «РИБО-преп®» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Для полногеномного секвенирования

методом NGS выделение суммарной РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия). Синтез кДНК проводили с помощью набора «PEBERTA-L» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) для фрагментарного секвенирования и с использованием набора «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» (ООО «Биолабмикс», Россия) для NGS.

3. Амплификация фрагмента ORF1/ORF2 – проводилась полимеразная цепная реакция с использованием праймеров MON431/GIISKR (для геногруппы GII) и MON432/GISKR (для геногруппы GI). В рамках адаптации алгоритма исходный протокол амплификации (MP 4.4/3.1.1.0230-21) был модифицирован.
4. Секвенирование и генотипирование – очистка ампликонов, секвенирование по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3130, определение нуклеотидных последовательностей. Идентификацию нуклеотидных последовательностей проводили с использованием онлайн-инструмента BLAST NCBI [31].
5. Полногеномное секвенирование методом NGS – для избранных генотипов проведено секвенирование полноразмерных геномов с использованием двух подходов: протокола SMART-9N и оригинального протокола обогащения, разработанного в рамках настоящего исследования. Протокол обогащения основан на синтезе оригинальной панели олигонуклеотидов, специфичных для генотипов GII.4[P16] и GII.7[P7], фланкирующих полноразмерный геном норовируса. Секвенирование подготовленных библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq.
6. Биоинформационная обработка и филогенетический анализ – осуществлялась сборка консенсусных последовательностей, множественное выравнивание (ClustalW), построение филогенетических деревьев (Neighbor-joining, Maximum Likelihood), оценка генетических дистанций (p-distance).
7. Статистический анализ – оценка случаев инфицирования двумя геногруппами в различных возрастных когортах, динамика распределения доминирующих генотипов с использованием критерия χ^2 , модели Пуассона. Рекомбинационный анализ нуклеотидных последовательностей.

8. Формирование коллекции нуклеотидных последовательностей – систематизация полученных последовательностей с эпидемиологическими метаданными в Excel формате (возраст, пол, сезонность, муниципалитет) для последующего анализа.

Адаптация в данном исследовании представляет собой модификацию существующих референсных протоколов применительно к клиническому материалу, а также разработку протоколов амплификации полноразмерных геномов норовируса в соответствии с техническими возможностями лаборатории. Адаптация включала три ключевых направления: модификацию протокола амплификации фрагмента ORF1/ORF2, разработку оригинального протокола обогащения для NGS-секвенирования, унификацию биоинформатической обработки.



Рисунок 4. Алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов

3.3 Биологические образцы

В период с февраля 2022 г. по декабрь 2024 г. в Свердловской области (Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Верхняя Пышма, Сухой Лог,

Первоуральск, Ревда, Невьянск, Бисерть, Краснотурьинск) проводился сбор образцов нативного фекального материала от пациентов с подтверждённым диагнозом «норовирусный гастроэнтерит» (код международной классификации болезней (МКБ-10): A08.1) (Таблица 1). Все образцы относились к случаям спорадической заболеваемости (не связанным между собой эпидемическими очагами). В настоящем исследовании проводилась идентификация нуклеотидных последовательностей генома норовируса в клинических образцах, полученных от 894 пациентов в период с 2022 по 2024 год (Таблица 2). Логистика биологического материала осуществлялась при взаимодействии с Управлением Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, ГАУЗ СО «КДЦ им. Я.Б. Бейкина», Государственным автономным учреждением здравоохранения Свердловской области «Детская городская больница» (г. Каменск-Уральский). Предоставление биологических образцов нативного фекального материала производилось в рамках действующего трехстороннего соглашения между учреждениями. Транспортировка и маршрутизация биологических образцов, а также соблюдение правил холодной цепи осуществлялись в соответствии с утвержденными стандартами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (от 28 января 2021 года N 4). Информированное согласие было получено от всех участников исследования. Все полученные биологические образцы предварительно верифицированы на наличие норовирусного патогена с помощью иммуноферментного анализа (Норовирус-антиген-иммуноферментный анализ-Best, Вектор-Бест, Новосибирск, Российская Федерация) и/или тест-системой с использованием ПЦР в реальном времени (АмплиСенс® Ротавирус/Норовирус/Астровирус-FL, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Российская Федерация).

Для исследования генов FUT сформирована выборка, включающая 265 добровольцев в возрасте 18 лет и старше, не имевших в анамнезе подтвержденного диагноза «норовирусный гастроэнтерит» на момент включения в исследование

(Таблица 3). Полиморфизмы генов FUT1 (локус H) и FUT2 (локус Se) являются конституциональными генетическими маркерами, не подверженными возраст-зависимой изменчивости, в связи с чем детальная возрастная стратификация не проводилась. Все участники являлись жителями г. Екатеринбурга и Свердловской области. Согласно данным Федеральной службы государственной статистики, этнический состав региона представлен преимущественно русскими (85,7%), что позволяет отнести выборку к европеоидной популяции. Сбор данных о поле не проводился, так как анализируемые гены локализованы на 19-й хромосоме (аутосоме) и не демонстрируют зависимых различий в частотах аллелей.

Минимальный объем выборки определяли исходя из необходимости выявления редких однонуклеотидных полиморфизмов с ожидаемой частотой минорного аллеля не менее 1% (0,01). При объеме выборки $n = 265$ вероятность обнаружения хотя бы одного носителя редкого аллеля с частотой 1% превышает 99%, что соответствует задачам скринингового популяционного исследования.

Биологическим материалом для исследования являлась лейкоцитарная фракция цельной венозной крови, которую отбирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА) объемом 5-10 мл. Отбор образцов проводился на базе ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора. Информированное согласие было получено от всех участников исследования (Таблица 4).

Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали для каждого SNP с использованием точного теста Фишера. Выбор данного метода обусловлен низкой частотой минорного аллеля – меньше 0,01 для всех анализируемых полиморфизмов, что делает применение критерия χ^2 некорректным из-за малых ожидаемых значений в ячейках таблицы сопряженности. Расчеты выполняли в программном пакете R (v. 3.4.4). Уровень значимости установлен на $\alpha = 0,05$. Равновесие считалось выполненным при $p > 0,05$.

Таблица 1. Материалы исследования, используемые для проведения генетического анализа возбудителей НВИ.

№ п/п	Этапы исследования	Материалы исследования	Количество	Период	Муниципалитет
1.	Формирование репрезентативной коллекции биологических образцов	Нативный фекальный материал от госпитализированных пациентов с подтверждённым диагнозом «Норовирусный гастроэнтерит» (код по МКБ-10: A08.1).	220	2022 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил
		Нативный фекальный материал от госпитализированных пациентов с подтверждённым диагнозом «Норовирусный гастроэнтерит» (код по МКБ-10: A08.1).	290	2023 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда
		Нативный фекальный материал от госпитализированных пациентов с подтверждённым диагнозом «Норовирусный гастроэнтерит» (код по МКБ-10: A08.1).	384	2024 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда, Невьянск, Бисерть, Краснотурьинск
2.	Проведение амплификации	Одноцепочечная кДНК участка норовирусного генома	440	2022 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил

	ции целевого участка норовирусн ого генома	Одноцепочечная кДНК участка норовирусного генома	580	2023 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда
	геногруппы GI/GII методом ПЦР	Одноцепочечная кДНК участка норовирусного генома	768	2024 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда, Невьянск, Бисертъ, Красноурьинск
3.	Идентифиц ированные нуклеотидн ые последоват ельности участка норовирусн ого генома	Ампликоны участка норовирусного генома ORF1/ORF2	76	2022 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил
		Ампликоны участка норовирусного генома ORF1/ORF2	120	2023 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда
		Ампликоны участка норовирусного генома ORF1/ORF2	220	2024 г.	Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил, Сухой Лог, Верхняя Пышма, Первоуральск, Ревда, Невьянск, Бисертъ, Красноурьинск

Таблица 2. Параметры отбора биологических образцов для проведения генетического анализа возбудителей НВИ.

1.	Критерии включения	Образец нативных фекалий, отобранный в острый период заболевания (1-3 сутки от начала клинических проявлений)
		Образец получен от пациента, госпитализированного в стационарное лечебное учреждение на территории Свердловской

		области с клиническим диагнозом «Норовирусный гастроэнтерит» (код по МКБ-10: A08.1).
		Верификация норовирусной этиологии заболевания, предшествующая включению в исследование, подтверждённая результатами: ИФА, ПЦР
		Наличие полной сопроводительной эпидемиологической записи (карты обследования) с указанием минимального набора данных: дата отбора, возраст пациента, место проживания (муниципалитет), предполагаемый источник заражения (при наличии)
2.	Критерии исключения	Неудовлетворительное качество биоматериала (несоответствующий объём, нарушение условий транспортировки и хранения, приводящее к деградации нуклеиновых кислот)
		Образец, полученный от пациента в период реконвалесценции (позднее 5-х суток болезни), что может приводить к значительному снижению вирусной нагрузки и повышать риск ложноотрицательных результатов или ошибок секвенирования

Таблица 3. Материалы исследования, используемые для проведения генетического анализа генов FUT1/FUT2.

№ п/п	Этапы исследования	Материалы исследования	Количество	Период	Муниципалитет
1.	Формирование репрезентативной коллекции биологических образцов	Лейкоцитарная фракция крови от добровольцев	265	2024 г.	Екатеринбург
2.	Идентифицированные SNP последовательности участка генов FUT1/FUT2	Участок ДНК, соответствующий второму экзону генов FUT1/FUT2	24	2024 г.	Екатеринбург

Таблица 4. Параметры отбора биологических образцов для проведения генетического анализа генов FUT1/FUT2.

1.	Критерии включения	Участие в исследовании на основании добровольного письменного информированного согласия
		Проживание в г. Екатеринбурге или прилегающих муниципальных образованиях Свердловской области
		Отсутствие симптомов острого гастроэнтерита (тошнота, рвота, диарея) и каких-либо острых инфекционных заболеваний на момент забора крови, а также в предшествующие 14 дней
		Возраст ≥ 18 лет (дееспособность для самостоятельного подписания информированного согласия)
		Наличие достаточного объема образца цельной крови (не менее 3-5 мл, в зависимости от метода выделения ДНК)
2.	Критерии исключения	Наличие в анамнезе диагноза «хронический гастроэнтерит», «болезнь Крона», «неспецифический язвенный колит» или других хронических заболеваний ЖКТ с частыми обострениями
		Невозможность выделения ДНК, её значительная деградация или несоответствие критериям чистоты, делающие дальнейший анализ (ПЦР, секвенирование) технически невозможным или потенциально недостоверным
		Любое волеизъявление донора о прекращении участия в исследовании на любом его этапе

Исследование получило одобрение Локального этического Комитета ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора (Протокол № 1 от 17.03.2022 г.). Исследование выполнено в рамках государственного задания (НИОКТР № 123051100045-0).

3.4 Выделение нуклеиновой кислоты норовирусов и генов FUT, ПЦР, секвенирование методом Сэнгера.

Биологические образцы нативного фекального материала подвергались аликвотированию в растворе ФСБ. Далее фекальную суспензию центрифугировали

3 мин. при 10000 об/мин. до образования надосадочной жидкости. Выделение норовирусной РНК производилось методом пересадения спиртов с использованием набора реагентов «РИБО-преп®» (ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва) в соответствии с протоколом производителя. В процессе реакции обратной транскрипции синтезировали одноцепочечную кДНК на матрице выделенной норовирусной РНК при использовании комплекта реактивов «РЕВЕРТА-L» (ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва) Лабораторный протокол обратной транскрипции предусматривал подготовку реакционной смеси для 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix вносили 5 мкл RT-G-mix-1, после чего смесь тщательно перемешивали на вортексе и осаждали капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. К полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы (MM1v), пипетируя смесь около 5 раз, далее перемешивали на вортексе с последующим осаждением капель с крышки пробирки. В подготовленные пробирки объемом 0,2 мл вносили реакционную смесь по 10 мкл. К получившемуся объему реакционной смеси добавляли 10 мкл РНК-пробы. Каждое добавление РНК-пробы сопровождалось пипетированием около 6-10 раз. Далее полученную смесь инкубировали в амплификаторе (Applied Biosystems Veriti® 96-Well Thermal Cycler, кат. № 4375786) при заданной температуре 37°C в течение 30 минут. По истечении 30-минутной инкубации полученную кДНК разводили ДНК-буфером до объема 20 мкл для последующей постановки ПЦР.

Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводилась при использовании коммерческой реакционной смеси 5X ScreenMix-HS, деионизированной воды и пары олигонуклеотидных праймеров. Выбранная пара праймеров фланкирует фрагмент норовирусного генома двух генетических групп (GI, GII), соответствующий региону ORF1/ORF2 (Таблица 5).

Олигонуклеотидная пара для GI (прямой – MON432; обратный – GISKR), для GII (прямой – MON431, обратный – GIISKR) (Рисунок 5) [98, 122]. Лабораторный протокол реакционной смеси для ПЦР в пересчете на один образец включал: 5 мкл окрашенной реакционной смеси 5X ScreenMix-HS, 0,7 мкл олигонуклеотидного

праймера (молярная концентрация – 20 пмоль/л), 13,6 мкл деионизированной воды, итоговый объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

Таблица 5. Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих участок ORF1/ORF2 норовирусного генома

Праймер	Последовательность праймера
MON 432	TGGACICGYGGICCYAAAYCA
GISKR	CCAACCCARCCATTRTACA
MON 431	TGGACIAGRGGICCYAAAYCA
GIISKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT

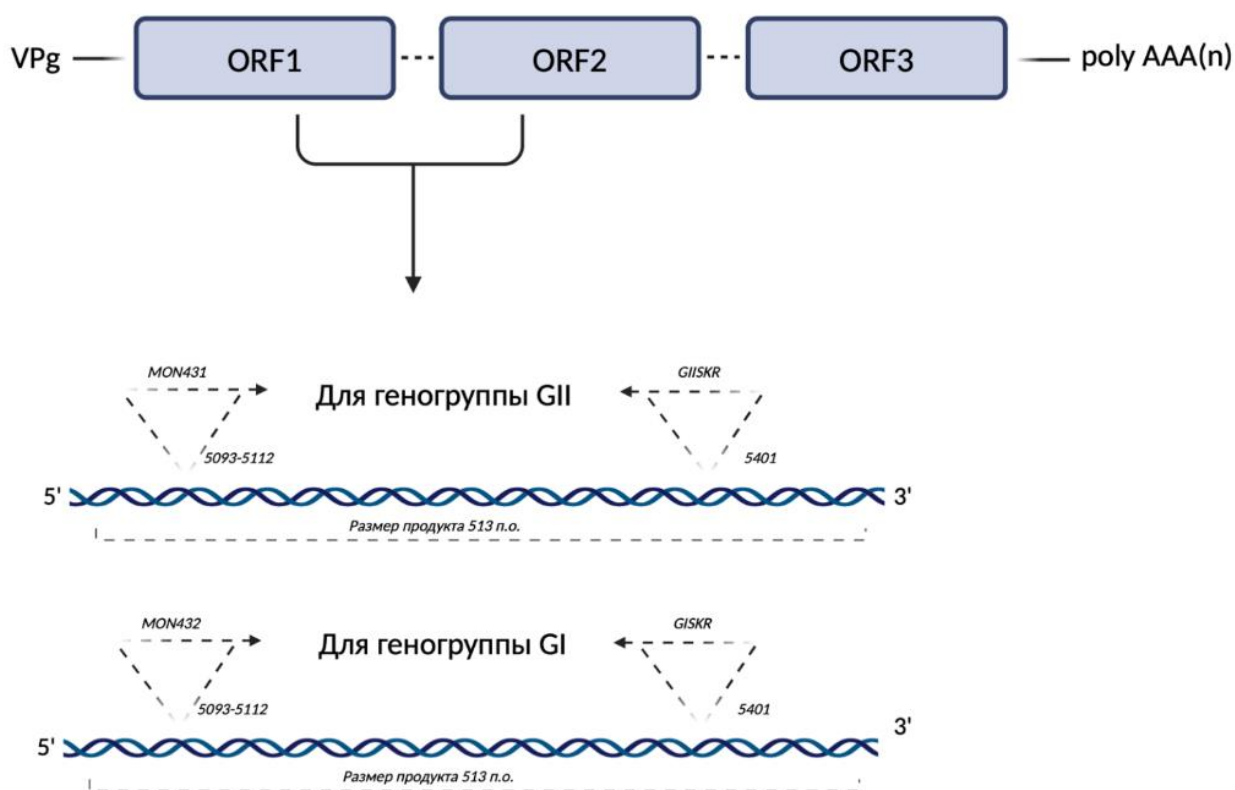


Рисунок 5. Пара вырожденных праймеров для амплификации целевого фрагмента ORF1/ORF2 в двух геногруппах норовирусного генома (Иллюстрация создана при помощи BioRender software).

Для проведения амплификации в реакционную смесь добавляли 5 мкл ДНК-матрицы, совокупный объем реакционной смеси вместе с ДНК-матрицей норовирусов составил 25 мкл. Амплификация проводилась на устройстве

компании Applied Biosystems Veriti® 96-Well Thermal Cycler. В качестве референсного протокола рассматривали методические рекомендации МР 4.4/3.1.1.0230-21 «Генотипирование в эпидемиологическом надзоре за норовирусной инфекцией», предусматривающие предварительную денатурацию 95°C – 15 мин, 40 циклов амплификации (95°C – 60 с, 50°C – 60 с, 72°C – 60 с) и финальную элонгацию 72°C – 2 мин. В ходе подготовки к исследованию референсный протокол был модифицирован с учетом особенностей клинического материала, а также технических возможностей лаборатории [9]. В результате был сформирован лабораторный протокол амплификации фрагмента ORF1/ORF2, параметры которого представлены в таблице 6.

Таблица 6. Модифицированный протокол амплификации фрагмента норовирусного генома

Параметр	Модифицированный протокол	Протокол (МР 4.4/3.1.1.0230-21)
Предварительная денатурация	95 °С – 5 мин	95 °С – 15 мин
Количество циклов	45	40
Денатурация (цикл)	94 °С – 30 с	95 °С – 60 с / 15 с
Отжиг (цикл)	51 °С – 30 с	50 °С – 60 с / 15 с
Элонгация (цикл)	72 °С – 1 мин	72 °С – 60 с / 15 с
Финальная элонгация	72 °С – 7 мин	72 °С – 2 мин

Модифицированный протокол по сравнению с референсным (МР 4.4/3.1.1.0230-21) обладает рядом преимуществ. Сокращение времени начальной денатурации с 15 до 5 минут позволяет снизить риск деградации матрицы и

сократить продолжительность анализа. Увеличение количества циклов до 45 повышает чувствительность метода при работе с образцами, содержащими низкую вирусную нагрузку. Повышение температуры отжига до 51 °С способствует увеличению специфичности амплификации. Увеличение времени финальной элонгации до 7 минут обеспечивает получение ампликонов, оптимально подходящих для последующего секвенирования. Универсальность температурно-временных параметров позволяет воспроизводить протокол на амплификаторах различных типов без потери эффективности.

Очистку продуктов амплификации проводили после электрофоретического разделения фрагментов в 2% агарозном геле (буфер ТБЕ, напряжение 180 В, время 30 мин.). Полученные ампликоны очищали из агарозного геля при помощи набора реагентов Cleanup Standard. Все манипуляции осуществлялись по протоколу производителя, при этом для получения высококонцентрированного образца кДНК объем добавляемого элюирующего раствора составил 30 мкл.

Образование целевых фрагментов генома с последующим прекращением синтеза цепи за счет присоединения дидеоксинуклеотидов проводилось при использовании комплекта реактивов: BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing Kit, BrilliantDye буфер, двух пар олигонуклеотидных праймеров (GI – MON432/GISKR, GII – MON431/GIISKR с молярной концентрацией – 3,2 пмоль/л). Лабораторный протокол приготовления реакционной смеси для цикла терминации по Сэнгеру, представленный в пересчете на один анализируемый образец, включал следующие компоненты: 0,5 мкл готовой смеси терминирующих дидезоксинуклеотидов BrilliantDye™ Terminator v3.1, 1,8 мкл соответствующего пятикратного (5X) буфера для секвенирования, а также 2 мкл раствора специфического олигонуклеотидного праймера с рабочей концентрацией 10 пмоль/мкл. Таким образом, итоговый объем готовой к постановке в амплификатор реакционной составлял 4,3 мкл, после чего к ней добавлялся подготовленный образец ДНК-матрицы.

К итоговому объему реакционной смеси добавляли 5,7 мкл очищенной матрицы, совокупный объем реакционной смеси вместе с ДНК-матрицей составлял

10 мкл. Секвенирование фрагмента норовирусного генома проводилось на капиллярном генетическом анализаторе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Биологические образцы в виде лейкоцитарной фракции венозной крови были получены для последующего генетического анализа генов FUT. Лейкоцитарную фракцию выделяли из цельной периферической крови, стабилизированной ЭДТА, путем центрифугирования при $400\times g$ в течение 30 мин. Полученные лейкоциты трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере.

В рамках адаптации протоколов амплификации для последующего генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1 и FUT2 использовали коммерческую реакционную смесь 5X ScreenMix-HS и синтезированные олигонуклеотидные праймеры.

Для модификации лабораторного протокола к условиям лаборатории проведён подбор оптимальной температуры отжига праймеров методом градиентной ПЦР в диапазоне 52-62 °С. Критериями выбора служили – наличие специфичного ампликона ожидаемого размера (электрофорез в 2% агарозном геле), отсутствие неспецифических продуктов, максимальная интенсивность флуоресценции целевого продукта. По результатам градиентной ПЦР оптимальной признана температура отжига 58 °С, обеспечивающая специфическую амплификацию целевых фрагментов второго экзона генов FUT1 и FUT2 во всех проанализированных образцах.

Выбранная пара праймеров фланкирует фрагмент ДНК второго экзона в генах FUT1/2, где чаще всего происходят мутационные события. Олигонуклеотидная пара праймеров для FUT1 (прямой – FUT1F, обратный – FUT1R), для FUT2 (прямой – FUT2F, обратный – FUT2R) [136]. Лабораторный протокол реакционной смеси для ПЦР в пересчете на один образец включал: 5 мкл окрашенной реакционной смеси 5X ScreenMix-HS, 0,5 мкл олигонуклеотидного праймера (молярная концентрация – 20 пмоль/л), 14 мкл деионизированной воды, итоговый объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Для проведения амплификации в реакционную смесь добавляли 5 мкл ДНК-матрицы, совокупный

объем реакционной смеси вместе с ДНК-матрицей генов FUT1/2 составил 25 мкл. Температурный профиль амплификации включал: начальную денатурацию 95 °С – 5 мин, 40 циклов амплификации, состоящих из денатурации при 95 °С – 15 с, отжига праймеров при 58 °С – 20 с, элонгации при 72 °С – 30 с, финальную элонгацию 72 °С – 30 с. Амплификация проводилась на устройстве компании Applied Biosystems Veriti® 96-Well Thermal Cycler. Очистка ДНК выполнялась путем разделения ПЦР смеси после проведения разделения фрагментов электрофорезом в 2% агарозном геле (буфер ТБЕ, напряжение 180 В, время 30 мин.).

Очистка ДНК от агарозного геля проводилась при помощи набора реагентов Cleanup Standard. Для получения высококонцентрированного образца ДНК объем добавляемого элюирующего раствора составил 30 мкл.

Терминацию синтеза цепи дидезоксинуклеотидами проводили с набором BrilliantDye™ Terminator (v3.1), BrilliantDye буфером и праймерами FUT1F/FUT1R, FUT2F/FUT2R (3,2 пмоль/л). Реакционная смесь на образец (0,5 мкл BrilliantDye, 1,8 мкл буфера, 2 мкл праймера) – 4,3 мкл. Перед амплификацией в ПЦР-смесь добавляли 5,7 мкл ДНК-матрицы (конечный объем – 10 мкл). Целевой фрагмент секвенировали методом капиллярного электрофореза на анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя

3.5 Проведение секвенирования нуклеотидных последовательностей полноразмерных норовирусных геномов методом next-generation sequencing (NGS)

3.5.1 Приготовление NGS-библиотек по протоколу SMART-9N

Экстракцию РНК из фекальной суспензии проводили с использованием набора ExtractRNA («EUROGEN», Россия) по протоколу производителя. Синтез кДНК и ПЦР выполняли с наборами «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» и ПЦР-смесью («БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)») (ООО «Биолабмикс», Россия) согласно лабораторному протоколу исследования SMART-9N [46]. В протокол

обратной транскрипции были включены праймеры, несущие на 5' конце адаптерные последовательности, необходимые для последующей амплификации и секвенирования. Концентрация каждого праймера в реакционной смеси составляла 10 мкМ (Таблица 7).

Таблица 7. Служебные последовательности праймеров для реакции обратной транскрипции

Праймер	Последовательность
ONT-RT-9N	5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACNNNNNNNN
ONT-TSO	5' – GCTAATCATTGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG

Далее проводился этап отжига праймеров на РНК-матрице с заданным температурным режимом (Таблица 8).

Таблица 8. Температурный профиль отжига праймеров со служебными последовательностями

Компоненты реакционной смеси 1	x1	Температурный режим
Праймер ONT-RT-9N	1 мкл	25°C – 2 мин 70°C – 3 мин 4°C – ∞ Lid: 105°C V1 = 12 мкл
Праймер ONT-TSO	0,3 мкл	
Вода для ПЦР (для разведения праймера)	0,7 мкл	
+ Матрица (РНК)	10 мкл	

Полученные объёмы смешивали с реакционной смесью для постановки обратной транскрипции, содержащей обратную транскриптазу, буферный раствор, олигонуклеотиды со служебными последовательностями, после чего проводили реакцию с заданным температурным режимом (Таблица 9).

Таблица 9. Температурный профиль проведения реакции обратной транскрипции

Компоненты реакционной смеси 2	x1	Температурный режим
RNAscribe RT ревертаза	1 мкл	25°C – 10 мин 42°C – 3 часа
Вода для ПЦР	3 мкл	85°C – 5 мин 4°C – ∞
Смесь 1 после отжига + Смесь 2	12+8 мкл	Lid: 105°C V1 = 20 мкл

Для постановки ПЦР приготавливалась реакционная смесь, содержащая один праймер и наработанную кДНК. Праймер разводился до рабочей концентрации 30 (Таблица 10).

Таблица 10. Температурный профиль ПЦР

Компоненты	x1	Температурный режим
БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)	15 мкл	95°C – 5 мин
Праймер ONT-PCR (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT)	1 мкл	94°C – 15 сек 62°C – 45 сек x 50 68°C – 4 мин 30 сек
Вода для ПЦР	4 мкл	
+ кДНК	10 мкл	68°C – 15 мин 4°C – ∞ Lid: 105°C, V1 = 30 мкл

Для этапов ферментативной фрагментации и лигирования адаптеров использовали наборы «FTP Display» (ООО «БиоЛинк», Россия); «LIB Display» (ООО «БиоЛинк», Россия). Очистку кДНК производили на магнитных частицах с использованием набора VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай).

3.5.2 Разработка оригинального протокола обогащения нуклеиновых кислот генотипов GII.4[P16], GII.7[P7] для реализации последующего секвенирования методом NGS

В рамках настоящего исследования был разработан оригинальный протокол обогащения норовирусной РНК для последующего полногеномного секвенирования. Протокол основан на синтезированной панели специфичных олигонуклеотидов, фланкирующих полноразмерный геном норовируса.

Панель олигонуклеотидов разработана для двух генотипов GII.4[P16] и GII.7[P7], идентифицированных в предварительных исследованиях как доминирующие на территории Свердловской области в анализируемый период. Для каждого генотипа синтезированы перекрывающиеся праймеры, обеспечивающие амплификацию всего генома со средним размером фрагментов 800-1000 п.н. Дизайн праймеров выполнен с использованием программного обеспечения Primer3, версия 1.1 и проверен на специфичность *in silico* [158]. Отработка протокола проведена на 10 контрольных образцах с известной нуклеотидной последовательностью генотипов GII.4[P16], GII.7[P7]. Критериями успешной валидации являлись – наличие специфичных ампликонов ожидаемого размера (электрофорез в агарозном геле), концентрация ДНК не менее 20 нг/мкл (флуориметр Qubit), качество сборки генома (покрытие не менее 95%, глубина прочтения не менее 50×). После валидации протокол применён для секвенирования полных геномов избранных генотипов.

3.5.3 Приготовление NGS-библиотек с использованием способа обогащения норовирусного генома

Представленный способ концентрирования норовирусных нуклеиновых кислот заключался в выделении суммарной РНК из образцов нативного фекального материала объемом 200 мкл с использованием метода фенол-хлороформной экстракции с набором ExtractRNA («EUROGEN», Россия).

Полученные образцы нуклеиновых кислот подвергали одноэтапной ОТ-ПЦР с использованием набора «Биолабмикс-премиум» (ООО «Биолабмикс», Россия) и панели специфичных олигонуклеотидов, покрывающих полный геном норовируса. (Таблица 11, Таблица 11.1).

Таблица 11. Панель олигонуклеотидов, фланкирующих полноразмерный геном генотипа GII.4[P16] (средняя длина фрагмента 800 п.н.)

Наименование	Последовательность	Направление	Длина праймера	Участок праймера	T° отжига
NV_GII.4_1F	GTGAATGAAGATGGC GTCTAACGA	F	24	1-24	56
NV_GII.4_1R	TGAGGTCTTTTATGGG YCTGGTG	R	23	807-830	56
NV_GII.4_2F	GCTGCTGGGTGTTAGA CCTCA	F	21	635-656	56
NV_GII.4_2R	CCTGGCYGCTGCTATT CGAG	R	20	1406- 1426	56
NV_GII.4_3F	CCACATGACAACCCTG TTGAAAGA	F	24	1266- 1290	56
NV_GII.4_3R	CACGGGCAATCAGAG AACCG	R	20	2027- 2047	56
NV_GII.4_4F	GGTCAGCCAGATATGT GGAAGG	F	22	1893- 1915	56
NV_GII.4_4R	GCTYAAGCCCTTGCTG GAGAATG	R	23	2668- 2691	56
NV_GII.4_5F	GCTCTGGTCGAAGCC ACAATYAG	F	23	2513- 2536	56
NV_GII.4_5R	GTTCCCATTCTGGCTG CAAGAG	R	22	3307- 3329	56

NV_GII.4_6F	GTCCCATCAAACAAA TCCAGATC	F	24	3145- 3169	56
NV_GII.4_6R	GAAGGTCTCACCATTC CAGAATTC	R	24	3949- 3973	56
NV_GII.4_7F	GGCAARCCTCCAAGA CCAAGTG	F	22	3786- 3808	56
NV_GII.4_7R	GGAATTTGCTTGATA ATGTCAGGGG	R	26	4546- 4572	56
NV_GII.4_8F	GTCGCTGAGGATCTAC TGGC	F	20	4387- 4407	56
NV_GII.4_8R	CTCTGGTACGAGGTTG GCTG	R	20	5121- 5141	56
NV_GII.4_9F	CAGGTGGATGAGGTTC TCTGAC	F	22	5010- 5032	56
NV_GII.4_9R	GGGATGGGGAATCTTG AATTGGTC	R	24	5788- 5812	56
NV_GII.4_10F	GCTGGGGATGATGTTT TCACAGTT	F	24	5648- 5672	56
NV_GII.4_10R	GTGGATCTAAAGAAG AGGAGTTGC	R	24	6364- 6388	56
NV_GII.4_11F	GCTGTAGCCCCACCT TTC	F	19	6337- 6356	56
NV_GII.4_11R	TAGCTCTTCCTGGCAG TGCC	R	20	7112- 7132	56
NV_GII.4_12F	CTTTGCTGGATTGGCA TCTGATGT	F	24	6714- 6735	56
NV_GII.4_12R	GAATGTGAGCGAAGA GAGGCTG	R	22	7459- 7481	56

Таблица 11.1. Панель олигонуклеотидов, фланкирующих полноразмерный геном генотипа GII.7[P7] (средняя длина фрагмента 1000 п.н.)

Наименование	Последовательность	Направление	Длина праймера	Участок праймера	T° отжига
NV_GII.7_1F	GTGAATGAAGATGGC GTCTAACGA	F	24	1-24	56
NV_GII.7_1R	GCAAУТСAAAATCACC TATCAGGG	R	24	980-1004	56
NV_GII.7_2F	GGACGTTTGCAGGYAT AGTRGAG	F	24	888-910	56
NV_GII.7_2R	TTAAAATGGTCYTTCC ACATGTCRG	R	25	1914- 1939	56
NV_GII.7_3F	GAGGCGTGTTCTAGG AGAGTTG	F	22	1828- 1850	56
NV_GII.7_3R	CTTGGCYTCTTCCTCT TCACAG	R	22	2823- 2845	56
NV_GII.7_4F	CTCTAGTAAAGGCCTA AGTGATGAAG	F	26	2674- 2700	56
NV_GII.7_4R	GTGGTAAGGCATCTGG TGATGAG	R	23	3655- 3678	56
NV_GII.7_5F	CACCTACTGTGGWGC CCCAAT	F	21	3582- 3603	56
NV_GII.7_5R	ARGAGTGAGCTTGGA CWACATCTG	R	24	4550- 4574	56
NV_GII.7_6F	GTCATCTCAGTCCAGG ARGG	F	20	4435- 4455	56
NV_GII.7_6R	AGCTGTGAACGCGTTC CCAG	R	20	5406- 5426	56

NV_GII.7_7F	GGGACCAGAATTGAA CCCCTATC	F	23	5321- 5344	56
NV_GII.7_7R	GCTGGAGCCAAATGG GTGTTATTG	R	24	6317- 6341	56
NV_GII.7_8F	CTACCAGAGCCCATGA AGCYAAC	F	23	6120- 6143	56
NV_GII.7_8R	CATATGAAGCAGACTG CAYAGG	R	22	7072- 7094	56
NV_GII.7_9F	GAGGCCAAGCTGCAT AAGCAAG	F	22	6540- 6562	56
NV_GII.7_9.1R	CACTAAATCTGTGACT CCCCTCG	R	23	7453- 7476	56
NV_GII.7_9.2R	TTTTTTTTTAAAAGAA AGAATTAAGGAACA G	R	32	7521- 7553	52

Для выделения суммарной РНК методом фенол-хлороформной экстракции в пробирки объемом 2 мл вносили 200 мкл исследуемой пробы, после добавляя 1 мл ExtractRNA (Евроген, Россия) и интенсивно перемешивая содержимое пробирки до появления гомогенной эмульсии с использованием центрифуги-вортекс. После смешивания смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Далее добавляли в пробирку 200 мкл хлороформа и интенсивно перемешивали содержимое пробирок с использованием центрифуги-вортекс. Инкубировали полученную смесь в течение 10 минут. После проводили центрифугирование пробирок со смесью 15 минут при 15000 об/мин +4°C для расслоения фаз. Прозрачную верхнюю фазу с РНК осторожно переносили, не задевая пограничную между фазами белую полоску с ДНК и белками, в чистую пробирку объемом 1,5 мл. Добавляли в пробирку объем изопропанола, около 360 мкл в соотношении 1:0.6, к смешанному объему добавляли 2 мкл красителя. Интенсивно

перемешивали содержимое пробирки с использованием центрифуги-вортекс, полученную смесь переносили в морозильник на -20°C на 30 минут. Следующим этапом проводили центрифугирование в течение 15 минут при 15000 об/мин. Полностью удаляли супернатант, переворачивая пробирку (удаление супернатанта отсасыванием связано с риском потери осадка РНК). Добавляли в пробирки 1 мл холодного 80% этилового спирта, перемешивая содержимое и переворачивая пробирки 4-5 раз, далее центрифугировали в течение 5 минут при 15000 об/мин и осторожно удаляли супернатант переворачивая пробирку. Высушивали осадок при температуре 37°C в течение 3 минут с открытыми пробирками. К конечному объему добавляли в пробирки 20 мкл деионизированной стерильной воды. Выделенную РНК хранили при температуре -70°C или немедленно использовали для работы.

Для ОТ-ПЦР использовали четыре пула праймеров (П1-П4, 10 мкМ), специфичных к генотипам GII.4[P16] и GII.7[P7] (Таблица 12, 12.1).

Таблица 12. Пул праймеров для генотипа GII.4[P16]

Пул №1		Пул №2	
NV_GII.4_1F	F	NV_GII.4_2F	F
NV_GII.4_1R	R	NV_GII.4_2R	R
NV_GII.4_3F	F	NV_GII.4_4F	F
NV_GII.4_3R	R	NV_GII.4_4R	R
NV_GII.4_5F	F	NV_GII.4_6F	F
NV_GII.4_5R	R	NV_GII.4_6R	R
NV_GII.4_7F	F	NV_GII.4_8F	F
NV_GII.4_7R	R	NV_GII.4_8R	R
NV_GII.4_9F	F	NV_GII.4_10F	F
NV_GII.4_9R	R	NV_GII.4_10R	R
NV_GII.4_11F	F	NV_GII.4_12F	F
NV_GII.4_11R	R	NV_GII.4_12R	R

Таблица 12.1. Пул праймеров для генотипа GII.7[P7]

Пул №3		Пул №4	
NV_GII.7_1F	F	NV_GII.7_2F	F
NV_GII.7_1R	R	NV_GII.7_2R	R
NV_GII.7_3F	F	NV_GII.7_4F	F
NV_GII.7_3R	R	NV_GII.7_4R	R
NV_GII.7_5F	F	NV_GII.7_6F	F
NV_GII.7_5R	R	NV_GII.7_6R	R
NV_GII.7_7F	F	NV_GII.7_8F	F
NV_GII.7_7R	R	NV_GII.7_8R	R
NV_GII.7_9F	F	-	-
NV_GII.7_9.1(9.2)R	R	-	-

Для формирования Пула №1; Пула №2 брали каждого праймера из пары (F и R) по 1 мкл в концентрации 100 мкМ и смешивали в одной пробирке (1+3+5+7+9+1 для Пула №1; 2+4+6+8+10+12 для Пула №2; 1+3+5+7+9 для Пула №3; 2+4+6+8 для Пула №4) Рабочую концентрацию пулов (10 мкМ) получали разведением 5 мкл исходного раствора в 45 мкл воды. На каждую пробу отводили 2 реакции (2 пробирки). Первую реакцию проводили только с праймерами Пул №1 или Пул №3, вторую только с праймерами Пул №2 или Пул №4. Разработанные праймеры фланкируют три открытые рамки считывания норовирусного генома генотипов GII.4[P16], GII.7[P7].

Для проведения ОТ-ПЦР подготавливали реакционную смесь с использованием набора биолабмикс-премиум от производителя ООО «Биолабмикс» (Россия). К реакционной смеси добавляли пул синтезированных праймеров и выделенную РНК-матрицу в объеме 5 мкл. Полученную смесь перемешивали на центрифуге-вортекс, сбрасывали капли и устанавливали пробирки в амплификатор в соответствии с температурным профилем (Таблица 13., 13.1).

Таблица 13. Приготовление реакционной смеси для проведения ОТ-ПЦР

Реакционная смесь	Объем на один образец (X1)
Смесь для ОТ-ПЦР	12,5 мкл
Вода	4 мкл
Праймеры (Пулы №1; №2; №3; №4)	2,5 мкл
Фермент	1 мкл
РНК-матрица 5 мкл + 20 мкл Смеси = V1: 25 мкл	

Таблица 13.1. Температурный профиль ОТ-ПЦР

Пулы №1; №2; №3; №4
45°C – 60 мин
93°C – 5 мин
93°C – 10 сек
56°C – 30 сек x44
68°C – 4 мин
68°C – 7 мин
4°C – ∞
Lid = 105 мкл
V1 = 25 мкл

После проведения ОТ-ПЦР полученные ампликоны очищали на магнитных частицах при использовании набора VAHNS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай) в соответствии с протоколом производителя. Очищенные концентрированные ампликоны были использованы для дальнейшего создания NGS-библиотек.

3.5.4 Измерение концентрации NGS-библиотек, подготовленных на основе протокола SMART-9N и протокола обогащения

Процедуру измерения концентрации проводили на флуориметре Qubit 4.0. Для измерения концентрации подготавливали необходимое количество пробирок

для калибровки двух стандартов Qubit и последующего определения концентрации ДНК в образцах. Приготавливали рабочий раствор для Qubit, разбавляя реагент Qubit™ dsDNA HS Assay Kit в соотношении 1:200 в буфере Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. Каждый раз при приготовлении рабочего раствора для Qubit™ использовали чистую пластиковую пробирку. Конечный объем каждой пробирки составлял 200 мкл. Для каждой стандартной пробирки требовалось 190 мкл рабочего раствора Qubit™, а для каждой пробирки с образцами – от 180 до 199 мкл. Затем добавляли по 10 мкл каждого стандарта Qubit™ в подготовленную пробирку. Далее вносили 1-20 мкл каждого исследуемого образца ДНК в соответствующую пробирку. Перемешивали содержимое пробирок в течение 3-5 секунд на центрифуге-вортекс. Инкубировали полученную смесь в течение 2 минут при комнатной температуре, затем переходили к определению результатов стандартов и образцов ДНК. По окончании измерения концентрации ДНК полученные NGS-библиотеки, подготовленные по двум комплементарным протоколам (SMART-9N и разработанному протоколу обогащения), были объединены в общую пробирку. Для пулирования отбирали образцы с концентрацией ДНК не менее 20-25 нг/мкл. Секвенирование NGS-библиотек, содержащих нуклеотидные данные, полученные по двум протоколам, проводили совместно на платформе Illumina MiSeq, что позволило унифицировать условия для всех библиотек независимо от использованного протокола подготовки. Подготовленный пул хранили при –20 °С до проведения секвенирования.

3.6 Биоинформационная обработка нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома, полноразмерных геномов норовирусов

Полученные нуклеотидные последовательности идентифицировали с помощью сервиса BLAST NCBI. Для формирования объективной внешней выборки при филогенетическом анализе из базы данных NCBI были отобраны эталонные последовательности норовирусов, обладающие как наибольшим

идентичности с типированными образцами, так и последовательности с наибольшей генетической дистанцией. Такой подход позволил обеспечить репрезентативность выборки, предотвратить снижение филогенетического сигнала и повысить достоверность оценки индексов поддержки внутренних узлов. Сборка консенсусных последовательностей, полученных на основе результатов типирования прямого/обратного прочтений, осуществлялась в программном обеспечении UGENE, версия 51 [139]. Для создания контигов нуклеотидных последовательностей в генах FUT1/FUT2 проводили множественное выравнивание на референсную последовательность генов FUT1/2 в программном обеспечении MEGA, версия 11. Сборка консенсусных последовательностей, полученных на основе результатов типирования прямого/обратного прочтений, осуществлялась в программном обеспечении UGENE, версия 51. Сборку геномных библиотек проводили при использовании алгоритмов DRAGEN v. 4.3.

3.7 Применение алгоритмов множественного выравнивания, филогенетический анализ, построение матрицы генетических дистанций

Для анализа большого массива данных генетических последовательностей применялся метод множественного выравнивания. Процессы множественного выравнивания генерировались при помощи алгоритмов кластерного анализа ClustalW [165]. Выбор данного алгоритма обусловлен тем, что анализ генетических данных основывается на принципах прогрессивного выравнивания, которые направлены на достижение оптимального согласования между последовательностями. На первом этапе алгоритм выбирает две наиболее схожие последовательности и выравнивает их путем сравнения каждого нуклеотида в соответствующих позициях. Затем путем сравнения третьей последовательности с уже выровненной парой последовательностей происходит расширение выравнивания, учитывая общие и различающиеся участки.

Для проведения филогенетического анализа была выбрана оптимальная эволюционная модель Kimura, наиболее адекватно описывающая эволюционные процессы между норовирусными генотипами [124]. В рамках параметрической эволюционной модели Kimura предполагается, что скорость замены нуклеотидов одинакова для каждой пары нуклеотидов, где равновесная частота каждого нуклеотида составляет 0.25, что в итоге приводит к равным ожидаемым частотам А, Т, С и G. Метод с двумя параметрами учитывает, что скорость замены нуклеотидов типа транзиции или трансверсии равновесна в условиях приближенным к реальным. Для реконструкции филогенетических деревьев был выбран метод присоединения соседей (Neighbor-joining) с использованием дистанционных методов определения эволюционных дистанций между анализируемыми последовательностями. Neighbor-joining основывается на построении неукорененной топологии дерева, где отсутствуют группы последовательностей и внутренние ветви. Затем алгоритм последовательно объединяет наиболее близкие таксоны, формируя дерево. Этот процесс позволяет постепенно формировать топологию дерева, учитывая эволюционные отношения между анализируемыми последовательностями норовирусов [60, 73]. Достоверность топологии аддитивных филограм оценивали методом повторных выборок на основании бутстреп анализа с 1000 псевдорепликаций.

Для определения наличия возможных синонимичных/несинонимичных замен в нуклеотидной последовательности норовирусных генотипов проводили анализ генетических расстояний между нуклеотидными/аминокислотными последовательностями при использовании матрицы генетических дистанций (p-distance matrix). Метод p-distance не использует сложные математические алгоритмы вычислений, сама модель представляет собой изучение доли нуклеотидных участков или аминокислот (p/a), в которых две сравниваемые последовательности различаются. Сравнение происходит путем деления числа различий в нуклеотидах или аминокислотах на общее число сравниваемых нуклеотидов или аминокислот. Метод лаконичен и не вносит никаких поправок на множественные замены в одном и том же месте, отклонений в коэффициентах

замещения или различий в темпах эволюции между сайтами. Для 3D визуализации синонимичных/несинонимичных замен в структуре фрагмента норовирусного генома ORF1/ORF2 осуществляли в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL [150].

Филогенетический анализ полноразмерных геномов норовируса проводили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием модели нуклеотидных замен Kimura 2-параметрическая. Достоверность топологии филогенетических деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 псевдорепликаций), ветви со значениями бутстреп-поддержки $\geq 70\%$ считали статистически достоверными.

Генетическую дистанцию между полногеномными аминокислотными последовательностями различных генотипов норовируса оценивали с помощью *p-distance matrix*. Расчеты выполнены в программе MEGA 11.

Визуализацию локализации синонимичных и несинонимичных замен в трехмерной структуре полипептидов (главный капсидный белок VP1) выполняли с использованием онлайн-платформы SWISS-MODEL. Нуклеотидные последовательности фрагмента/полноразмерного генома норовируса, полученные в настоящем исследовании, депонированы в международную базу данных GenBank NCBI.

3.7.1 Формирование набора референсных последовательностей и оценка генетической дивергентности

Для филогенетического анализа и оценки генетической дивергентности использованы референсные нуклеотидные последовательности, отобранные из международной базы GenBank. Отбор осуществляли по следующим критериям: последовательности верифицированы в онлайн-инструменте BLAST NCBI, включены последовательности, депонированные в GenBank для норовирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации и других зарубежных стран.

Полный перечень референсных последовательностей с указанием Accession Numbers, названий и географического происхождения представлен в приложении 1 (фрагмент ORF1-ORF2) и приложении 2 (полноразмерные геномы).

Для оценки генетической дивергентности анализируемых нуклеотидных последовательностей фрагмента норовирусного генома (ORF1/ORF2 – 500 п.н.) использовали метод p-distance в MEGA, версия 11. Для каждого анализируемого генотипа рассчитывали генетическую дистанцию между всеми референсными последовательностями соответствующего генотипа, включённых в филогенетический анализ. Поскольку для фрагментов данной длины отсутствуют общепринятые пороговые значения дивергенции, отнесение последовательностей к определенным генотипам проводилось на основе кластеризации с референсными последовательностями при уровне бустрэп-поддержки >70 %. Для оценки уровня генетической дивергенции использована описательная градация, основанная на эмпирическом распределении генетических расстояний в исследуемой выборке, где 2-5 % – низкий уровень дивергенции; 5-10 % – средний уровень дивергенции; более 10 % – высокий уровень.

Для оценки генетической дивергентности полноразмерных геномов норовирусов (длина – 7,5 тыс. п.н.) использовали метод p-distance в программном обеспечении MEGA, версия 11. На основании литературных данных установлены следующие пороговые значения, где дивергенция на уровне 5 % и менее по аминокислотной последовательности VP1 характерна для генетических вариантов внутри одного генотипа; дивергенция в диапазоне 10-20 % соответствует высокой внутригенотипической дивергенции [102].

3.8 Используемые статистические методы обработки данных

При анализе частоты обнаружения генетических групп GI-GII в различных возрастных контингентах на территории Свердловской области использовали общепринятые статистические приемы. Статистическую значимость различий категориальных данных оценивали по критерию χ^2 Пирсона. Различия считали

значимыми при $p \leq 0,05$. При сравнении частоты случаев инфицирования в геногруппах GI-GII между разными возрастными когортами на первом этапе проводили расчет значения p в целом для всей выборки, а далее – post-hoc анализ для выявления различий между в разных возрастных группах. Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера для каждого SNP. Статистическую обработку результатов и их визуализацию выполняли с использованием программ PAST, Statistica, версия 12.0, IBM SPSS Statistics, версия 26 и статистической среды R, версия 3.4.4. Оценку динамики идентифицированных образцов с подтвержденными геногруппами GI-GII в разных возрастных контингентах проводили при помощи модели Пуассона с фиксированными эффектами. Оценка рекомбинационной изменчивости осуществлялась при использовании программного обеспечения SimPlot, версия 2003.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Генетическая характеристика идентифицированных нуклеотидных последовательностей норовирусных генотипов на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.

Исследование генетического разнообразия норовирусов в двух генетических группах (GI-GII) включает актуальные результаты по особенностям циркуляции идентифицированных генотипов на территории Свердловской области за 2022-2024 гг. Таким образом, за весь анализируемый период общее количество исследованных образцов нативного фекального материала от больных с подтвержденным методами ИФА и/или ПЦР в реальном времени диагнозом составило $n = 894$. По результатам секвенирования фрагмента норовирусного генома проведено типирование 416 нуклеотидных последовательностей, что составляет 47 % от общего объема изучаемой выборки. Наибольший удельный вес идентифицированных нуклеотидных последовательностей норовирусов приходится на вторую генетическую группу (GII – 90 %), на первую генетическую группу (GI) приходится 10 %. Распределение обнаруженных норовирусов по геногруппам на территории Свердловской области согласуется с общемировыми тенденциями циркуляции генетических групп, где норовирусы, относящиеся к геногруппе GII, занимают доминирующее положение в структуре заболеваемости как педиатрической популяции, так и в популяции лиц старше трудоспособного возраста. Низкий процент обнаружения норовирусов GI обусловлен триадой факторов: индивидуальное географическое распределение, где большая группа геновариантов сконцентрирована в странах Восточной Азии (КНДР, Республика Корея, Япония, Китайская Республика, Китайская Народная Республика), формирование иммунной прослойки в человеческой популяции, меньший охват лабораторными исследованиями в менее крупных субъектах Российской

Федерации, что затрудняет индикацию объективной популяции норовирусов геногруппы GI.

По результатам молекулярно-генетического анализа на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области генотипический профиль обнаруженных норовирусов представлен в основном генотипами GII.4, GII.7, GII.17, а также полимеразными типами [P16], [P7], [P17] в 2022-2024 гг. (Рисунок 6). За весь период исследования регистрировалась последовательная смена доминирующих генотипов главного капсидного белка, а также типов полимеразы. Важно отметить, что за аналитический период 2022 года молекулярно-генетическая характеристика возбудителей НВИ проводилась на основе стандарта VP1-типирования, основываясь на секвенировании региона С. В ходе выполнения исследования проводилось депонирование нуклеотидных последовательностей в международную базу данных GenBank NCBI, n = 251 (приложение 3).

По результатам за 2022 год доминирующими генотипами являются GII.17 (n = 32/76, 42%) и GI.3 (n = 17/76, 22%), а преобладающей геногруппой является GII (66%), удельный вес GI составил 34%. В 2023 году доминирующими генотипами являются GII.4 (n = 58/120, 48%) и GII.17 (n = 33/120, 33%), преобладающей геногруппой является GII (98%) [38]. В 2024 году наблюдается тенденция к частичной смене циркуляции норовирусных генотипов, которые преобладали в период с 2022-2023 гг. По результатам молекулярно-генетического анализа регистрируется увеличение числа норовирусных нуклеотидных последовательностей, относящихся к GII.

В 2024 году распределение норовирусных генотипов повторяет результаты, полученные в 2023 году, где лидирующим генотипом является GII.4[P16] (n = 88/220, 40%). Также регистрируется экспоненциальный рост генотипа GII.7[P7] (n = 86/220, 39%), примечательно, что за анализируемый период 2022-2023 гг. GII.7[P7] обнаруживался в меньшем количестве. Наблюдается тенденция к снижению числа идентифицированных генотипов GII.17[P17] в сравнении с прошлыми анализируемыми годами (n = 14/220, 6%).

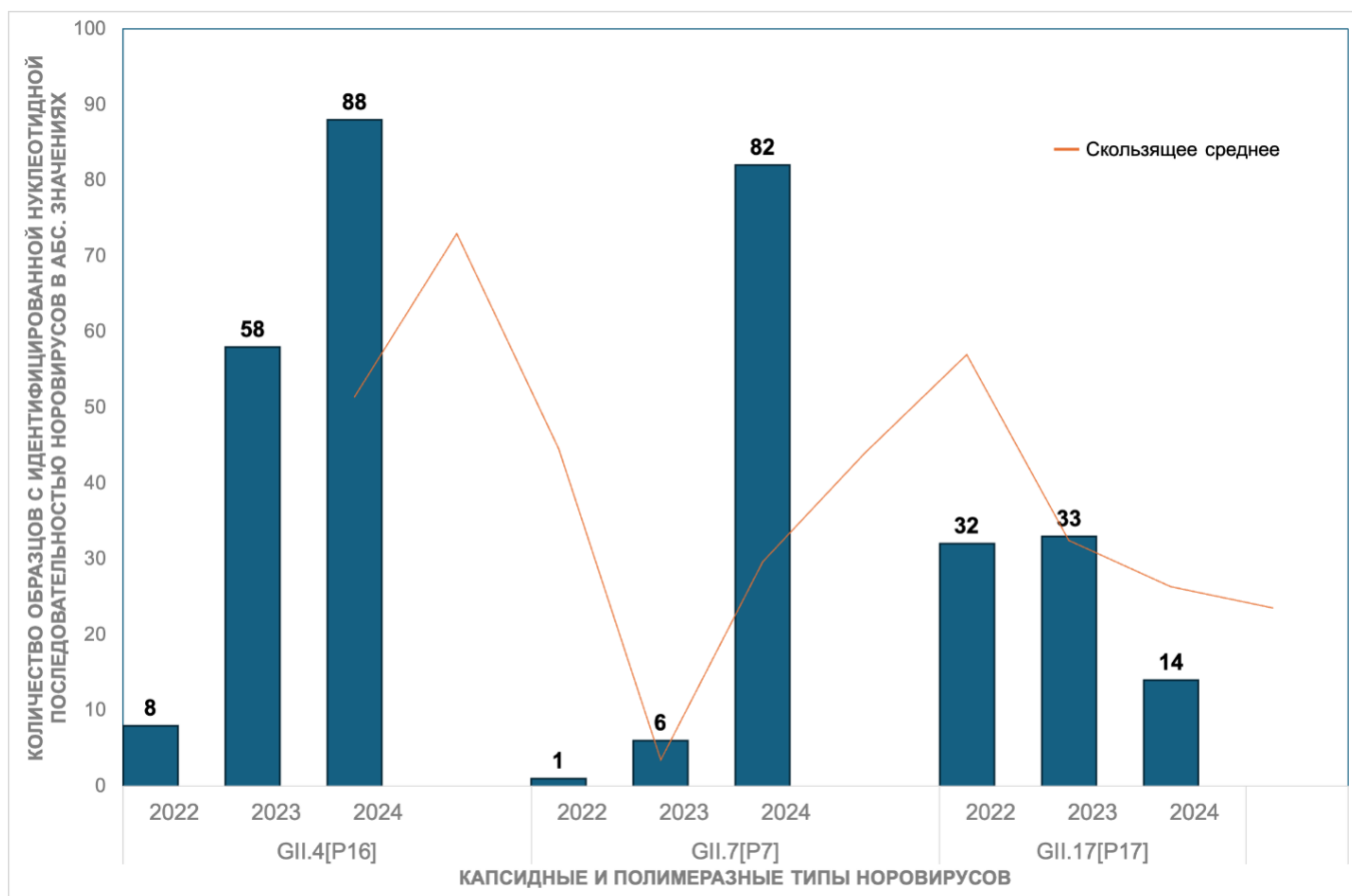


Рисунок 6. Динамика распределения доминирующих генотипов норовирусов геногруппы GI (по капсидному и полимеразному типу) на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.

Для оценки достоверности изменений в структуре циркулирующих генотипов норовируса за период 2022-2024 гг. был применён критерий χ^2 Пирсона. Установлено, что распределение выявленных генотипов по годам не является случайным ($\chi^2 = 99,87$, $df = 4$, $p < 0,001$). Это свидетельствует о наличии статистически значимой динамики в циркуляции различных генотипов на протяжении исследуемого временного периода.

При попарном сравнении частот выявления для каждого из анализируемых генотипов также обнаружены статистически значимые изменения. Таким образом, в исследуемый период произошла статистически достоверная смена доминирующих генотипов (Таблица 14).

Таблица 14. Статистически значимые изменения в структуре генотипов норовирусов GII на территории Свердловской области в 2022-2024 гг.

Генотип	χ^2	df	$p < 0,005$	Тренд
GI.4[P16]	35,2	2	< 0,001	Рост (стабилизация в 2024)
GI.7[P7]	56,5	2	< 0,001	Резкий рост (2024)
GI.17[P17]	94,5	2	< 0,001	Снижение (ежегодно)
Общая динамика	99,87	4	< 0,001	Смена доминирования

В 2024 году генотипический профиль норовирусов также включал идентифицированные эксклюзивные капсидные/полимеразные типы, относящиеся к геногруппе GI, которые ранее не были идентифицированы на территориях отдельных муниципалитетов Свердловской области: GI.7[P7] ($n = 6/220$, 3%), GI.6[P11] ($n = 3/220$, 1%), GI.2[P2] ($n = 7/220$, 3%) (Рисунок 7). Выявление данных генотипов свидетельствует об изменении структуры популяции норовирусов на локальных территориях и требует дальнейшего мониторинга для оценки их эпидемического потенциала.

За весь анализируемый период 2022-2024 гг. к числу прочих регистрируемых норовирусов, относящихся к геногруппе GII, определялись капсидные и полимеразные типы GII.6[P7], GII.8[P8], GII.3[P12], GII.15, GII.10, GII.12, GII.2 (Рисунок 8). Отмечается увеличение процента выявляемости нуклеотидных последовательностей норовирусов от общего числа исследованных образцов, который в 2022 г. составил 33 %, в 2023 г. – 41 %, в 2024 г. – 56 %.

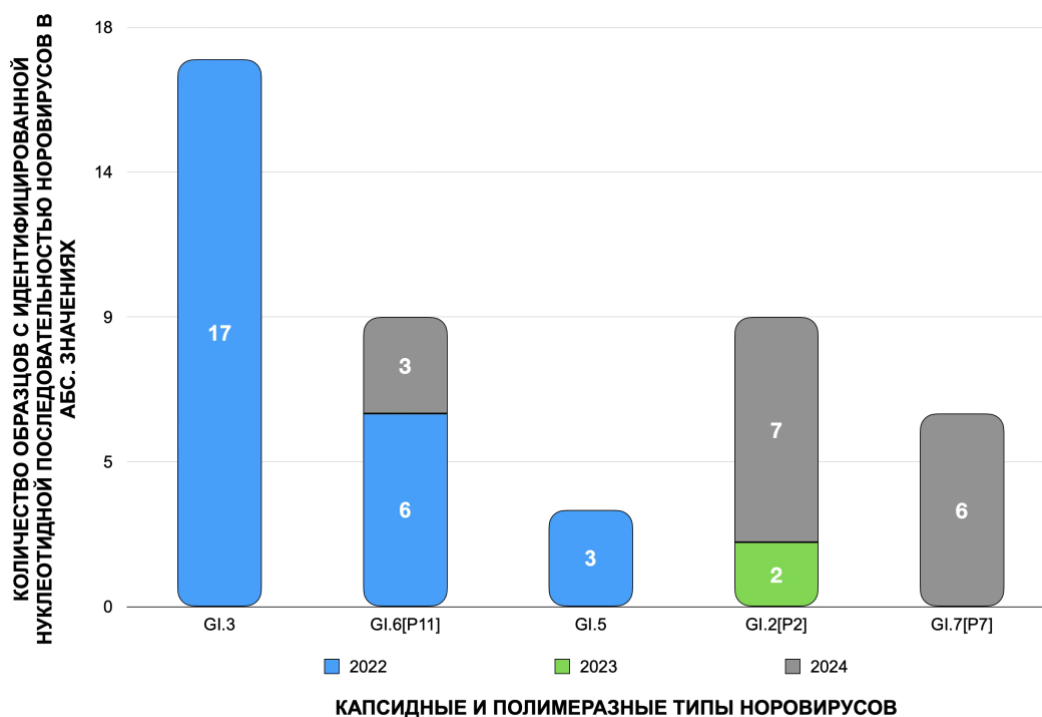


Рисунок 7. Динамика распределения капсидных/полимеразных типов норовирусов геногруппы GI на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.

Наблюдается тенденция к смене лидирующего GII.4[P16] на фоне быстрого экспоненциального роста GII.7[P7] в 2024 году. При оценке динамики циркуляции норовирусов геногруппы GI на территории Свердловской области за анализируемый период 2022-2024 гг. выявлено значительное многообразие генотипического профиля. Установлено, что на смену доминировавшему ранее GI.3 пришли другие генотипы, такие как: GI.2, GI.4, GI.5 и GI.6. Данное генетическое разнообразие указывает на активное изменение генотипического профиля норовирусов GI в регионе и требует продолжения углубленного молекулярно-эпидемиологического мониторинга для своевременного прогнозирования эпидемических подъемов. В 2022 году низкий уровень выявляемости обнаруженных GII.14[P16], по-видимому, обусловлен постпандемическим периодом и установленными противоэпидемическими мероприятиями. Примечательно, что доминирующие капсидные типы GII.4, GII.17 и полимеразные типы GII.P16, GII.P17 ежегодно идентифицировались до пандемии COVID-19.

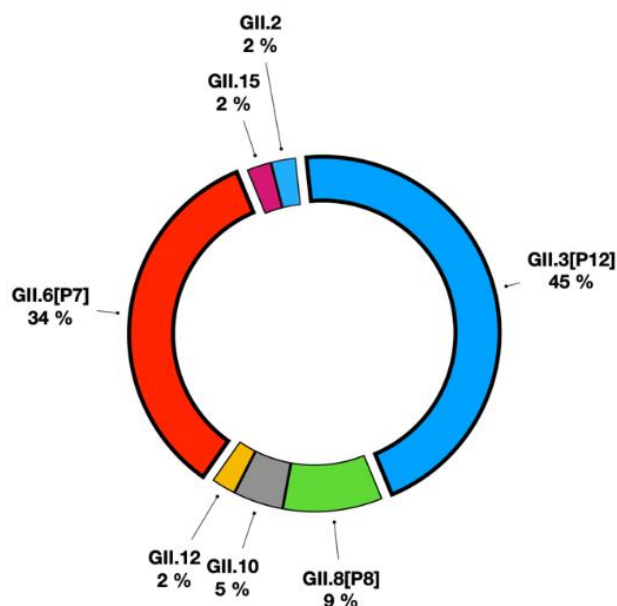


Рисунок 8. Удельный вес малораспространенных норовирусных генотипов, относящихся к геногруппе GI, идентифицированных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области, 2022-2024 гг.

Идентифицированные генотипы, отнесенные к геногруппе GI, ранее не обнаруживались на территории Свердловской области, что, вероятно, способно указывать на завозные случаи инфекции. В 2024 году генотип GII.7[P7] полностью вытеснил GII.17[P17]. Для более объективной оценки норовирусной популяции и формулировки гипотез о возможной смене циркуляции необходимо дальнейшее проведение молекулярно-генетического мониторинга на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области.

Таким образом, результаты проведенного анализа генетического разнообразия норовирусов на территории Свердловской области за 2022-2024 гг. демонстрируют уникальный генотипический профиль норовирусов, характеризующийся выраженным доминированием геногруппы GI. Ключевой особенностью является последовательная смена доминирующих генотипов – от лидерства GII.17[P17] в 2022 году к доминированию GII.4[P16] в 2023 году и экспоненциальному росту рекомбинантного GII.7[P7] в 2024 году, который практически полностью вытеснил ранее циркулировавший GII.17[P17].

Существенной характеристикой локальной циркуляции стало обнаружение ранее не регистрировавшихся на территории области генотипов GI (GI.7[P7], GI.6[P11], GI.2[P2]), что может свидетельствовать о завозных случаях инфекции. Сравнительный анализ с мировыми данными подтвердил как соответствие основных тенденций циркуляции (доминирование GII.4), так и уникальность местного генотипического профиля, выраженную в преобладании GII.7[P7] при низкой распространенности характерных для других регионов генотипов GII.3, GII.2 и GII.6.

Полученные результаты подчеркивают необходимость продолжения системного молекулярно-генетического мониторинга норовирусной инфекции на региональном уровне. Такие исследования являются критически важной основой для адекватного прогнозирования эпидемической ситуации и разработки научно обоснованных, целенаправленных профилактических мероприятий. При этом особое внимание должно уделяться филогенетическому профилю и выявлению новых генетических вариантов вируса, что позволяет адаптировать стратегии контроля с учетом постоянно меняющейся специфики местной циркуляции возбудителя.

4.2 Анализ встречаемости генетических групп GI-GII в различных возрастных контингентах на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.

По результатам генетического анализа все поступившие образцы нативного фекального материала от больных пациентов с НВИ верифицированы на наличие двух генетических групп GI-GII. На основании полученных данных эпидемиологического анамнеза от пациентов сформирована периодизация по возрастным контингентам, где анализировалась частота обнаружения геногрупп GI-GII в каждой сравниваемой группе возрастов. Учитывая существующие данные эпидемиологического анамнеза от пациентов, возрастные когорты выстроены следующим образом (Рисунок 9). Характеристика образованных возрастных групп

демонстрирует превалирование геногруппы GII во всех контингентах, что также подтверждается результатами научных исследований во всем мире [85]. Большое число зарегистрированных случаев инфицирования норовирусами геногруппы GII приходилось на возрастные группы в диапазоне от 1-2 лет, 3-6 лет, 7-9 лет и 10-14 лет. Наибольшая частота встречаемости норовирусов геногруппы GII была зарегистрирована в возрастной группе детей от 3 до 6 лет. Выявленная возрастная структура заболеваемости статистически значимо согласуется с глобальными эпидемиологическими тенденциями, описанными в международных исследованиях. Многочисленные работы, проведенные в разных странах, также демонстрируют, что высокая заболеваемость инфекцией, ассоциированной с норовирусами GII, приходится преимущественно на детей раннего возраста – от 1 до 59 месяцев [29, 37, 43, 93, 101, 160, 168]. Такая универсальность возрастного распределения, вероятно, обусловлена сочетанием иммунологических факторов, связанных с созреванием адаптивного иммунитета, и поведенческих особенностей данной когорты, способствующих интенсивному распространению фекально-орального патогена в организованных коллективах. Следовательно, полученные данные не только подтверждают общемировые закономерности, но и обосновывают необходимость целенаправленного эпидемиологического надзора и разработки специфических профилактических мер для педиатрической популяции.

Несмотря на ограниченное количество идентифицированных образцов норовирусов геногруппы GI в общей структуре генетического разнообразия, их доля при распределении данных по возрастным группам оказывается значительной. Данное наблюдение свидетельствует о том, что невысокое абсолютное число находок GI не отражает их потенциально высокую эпидемиологическую роль в отдельных возрастных когортах, что делает необходимым учёт возрастного фактора при анализе циркуляции различных геногрупп норовируса.

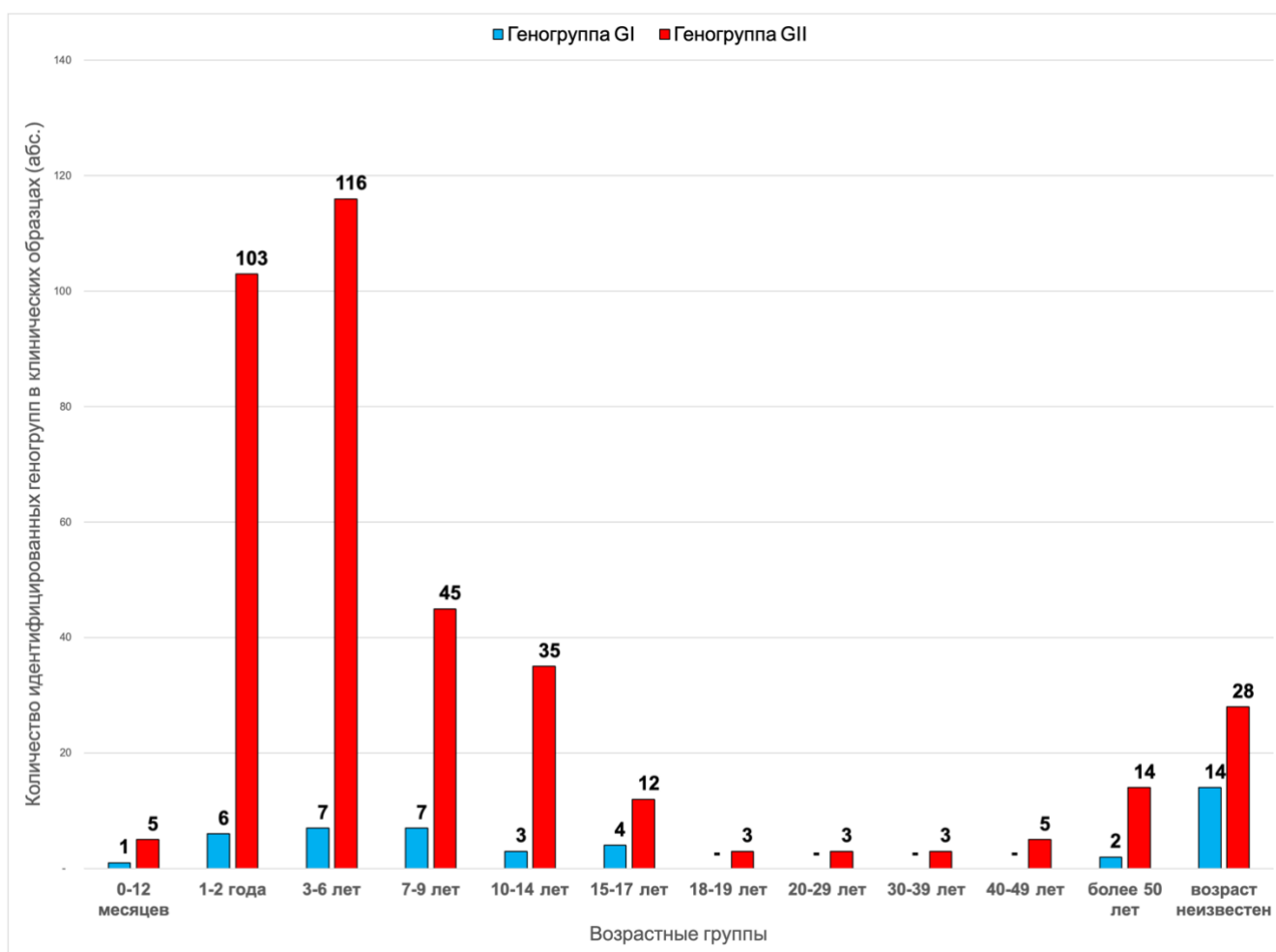


Рисунок 9. Гистограмма распределения идентифицированных норовирусных образцов с подтвержденными геногруппами GI-GII в разных возрастных контингентах на территории Свердловской области, 2022-2024 гг. (абс., n = 416)

Это указывает на то, что при относительно низкой общей распространенности, норовирусы GI демонстрируют выраженную возрастную ассоциацию и составляют существенную часть этиологической структуры инфекции в определенных когортах (Рисунок 10). Высокая частота встречаемости норовирусов геногруппы GI в разных возрастных группах, вероятно, обусловлена отсутствием сформированной иммунной прослойки в педиатрической популяции от 1 года до 18 лет по причине циркуляции экзотических геновариантов, для которых Свердловская область не является эндемичным ареалом распространения. Высокая частота GI у лиц старше 50 лет может быть связана с циркуляцией экзотических вариантов и возрастным иммунодефицитом.

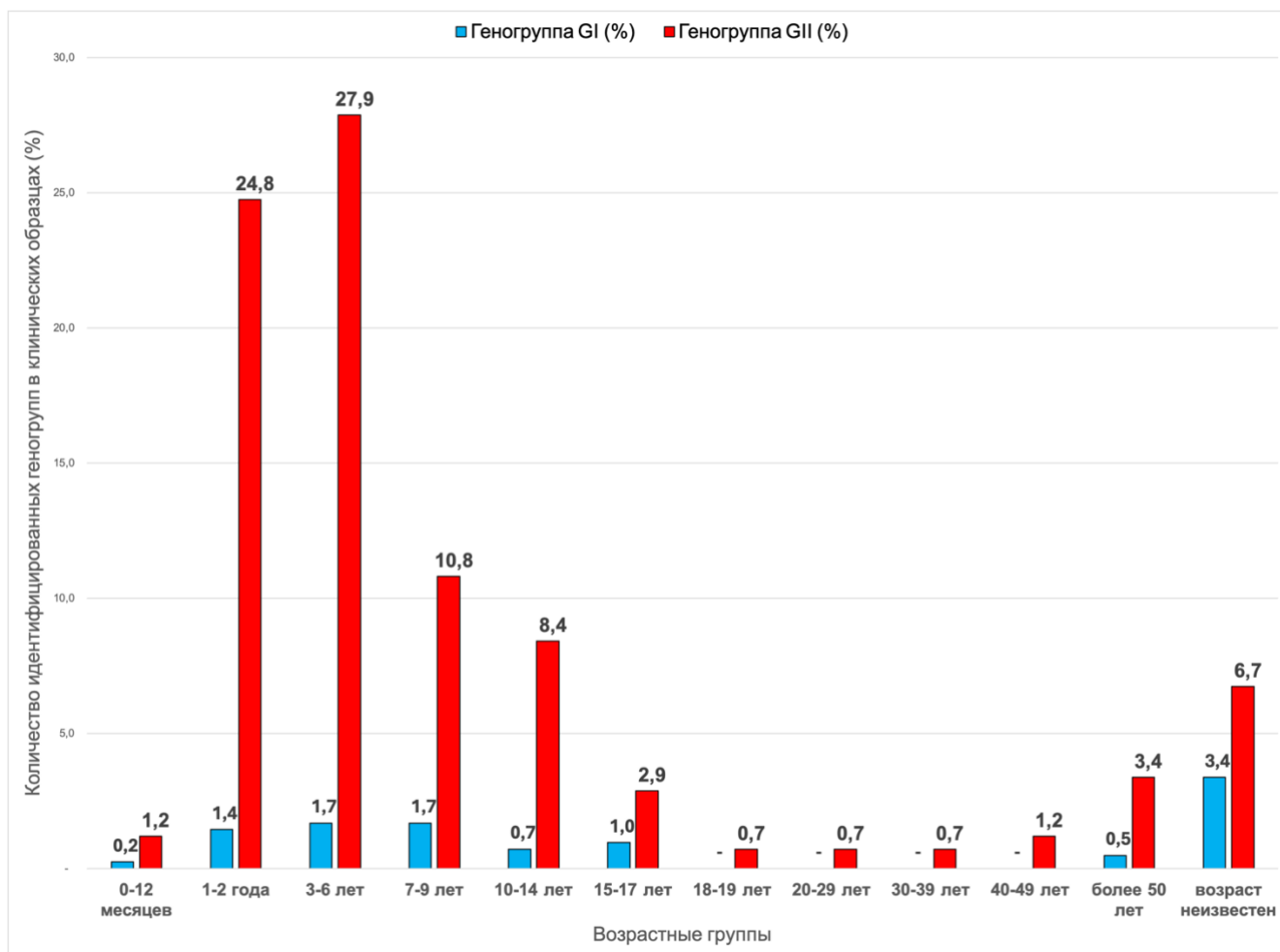


Рисунок 10. Гистограмма распределения идентифицированных норовирусных образцов с подтвержденными геногруппами GI-GII в разных возрастных контингентах на территории Свердловской области, 2022-2024 гг. (%), $n = 416$)

Регрессионный анализ при применении модели Пуассона с фиксированными эффектами демонстрирует следующие закономерности в динамике идентифицированных норовирусных образцов с подтвержденными геногруппами GI-GII в разных возрастных контингентах: регистрируется экспоненциальный рост частоты обнаружения норовирусных образцов для геногруппы GI-GII в возрастной период от 0 до 2 лет, где прирост частоты обнаружения для геногруппы GII составляет – 200%, при $p < 0,001$, а для GI – 100% при $p = 0,18$ (Рисунок 11), в группе сравнения от 3 до 10 лет регистрируется экспоненциальный спад для геногруппы GII, где снижение частоты обнаружения составляет – 24,41%, при $p < 0,001$. Для возрастного периода от 11 до 17 лет также регистрируется экспоненциальный спад в геногруппе GII, который составляет – 23,22%, при $p < 0,002$. В геногруппе GI у

возрастных групп от 3 до 10 лет, от 11 до 17 лет отмечается волнообразная динамика частоты обнаружения идентифицированных образцов, где снижение/прирост частоты обнаружения отличается от возрастного периода 0-2 лет на 0,74% для возрастной группы от 3 до 10 лет, при $p = 0,95$, и 8,74% для возрастной группы от 11 до 17 лет, при $p = 0,95$. В возрастной группе от 18 до 50 лет и выше регистрируется стабильный ряд динамики частоты идентифицированных образцов для геногруппы GI-GII с незначительными пиками в геногруппе GI, при $p = 0,40$.

Одним из важных этапов исследования стала объективная верификация визуально наблюдаемых возрастных паттернов в распространении геногрупп. С целью статистического моделирования связи между возрастом пациентов и частотой выявления норовирусов GI и GII был использован регрессионный анализ на основе модели Пуассона с фиксированными эффектами. Выбор данной модели обусловлен характером данных, где зависимая переменная (число образцов) является счетной и часто распределена согласно закону Пуассона. Фиксированные эффекты для возрастных когорт позволяют учесть и нивелировать влияние скрытых конфаундер факторов, специфичных для каждой возрастной группы, но не меняющихся в течение периода наблюдения, что повышает надежность оценок истинного возрастного тренда. Данное различие в возрастном распределении геногрупп подчеркивает необходимость обязательного учета возрастного фактора при разработке стратегий эпидемиологического надзора. Более того, оно определяет приоритетность целевых профилактических мероприятий, которые в первую очередь должны быть нацелены на контроль распространения высокопатогенных вариантов GII среди детей первых лет жизни.

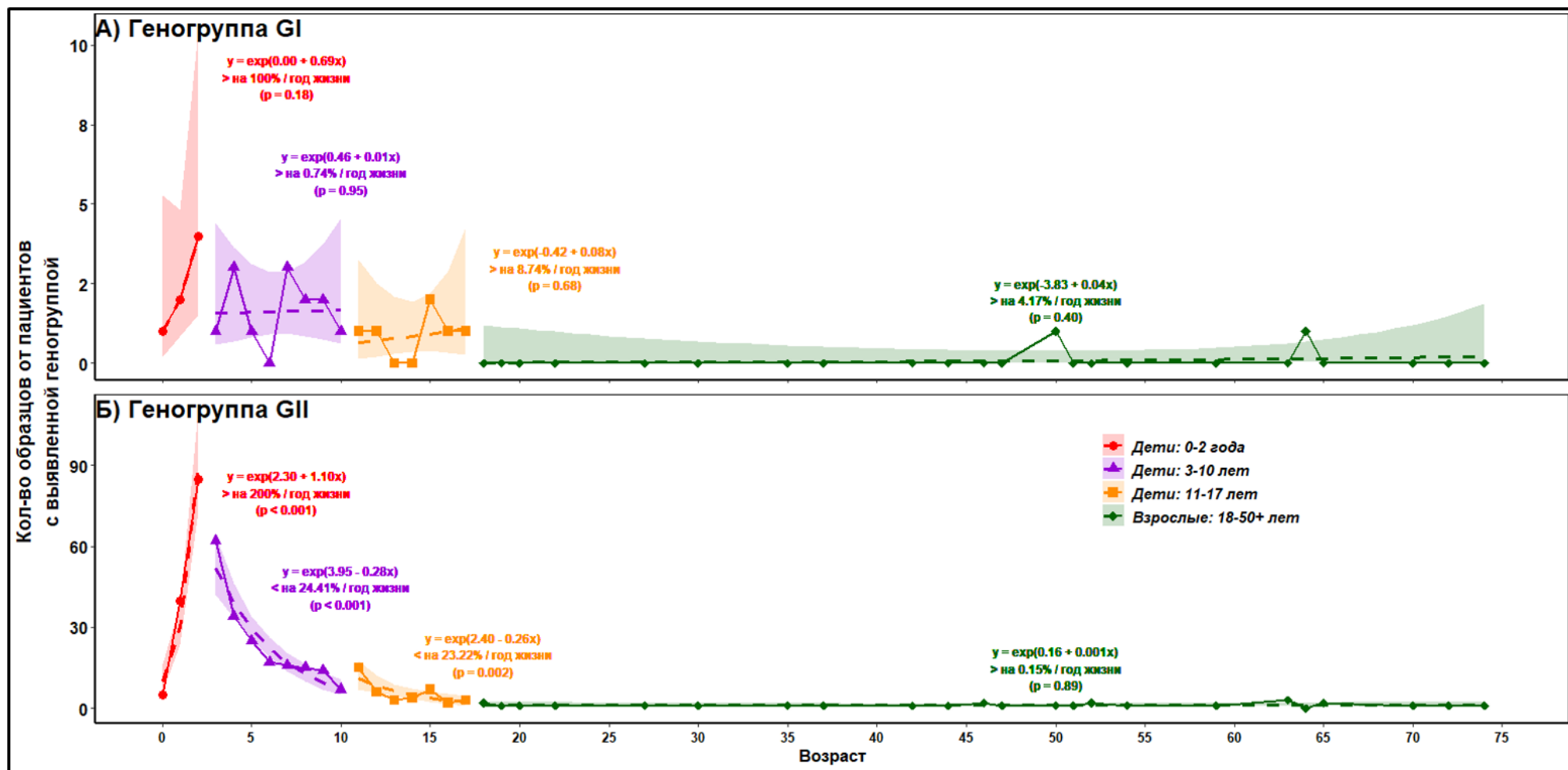


Рисунок 11. Аппроксимация частоты обнаружения норовирусных геногрупп GI-GII в различных возрастных группах

В исследуемых геногруппах GI-GII для разных возрастных контингентов выявлены статистически значимые различия в возрастной группе от 3 до 10 лет, при $p < 0,05$ (Рисунок 12). Отсутствие значимости в других группах связано с малым числом идентифицированных норовирусов геногруппы GI (статистический переко).

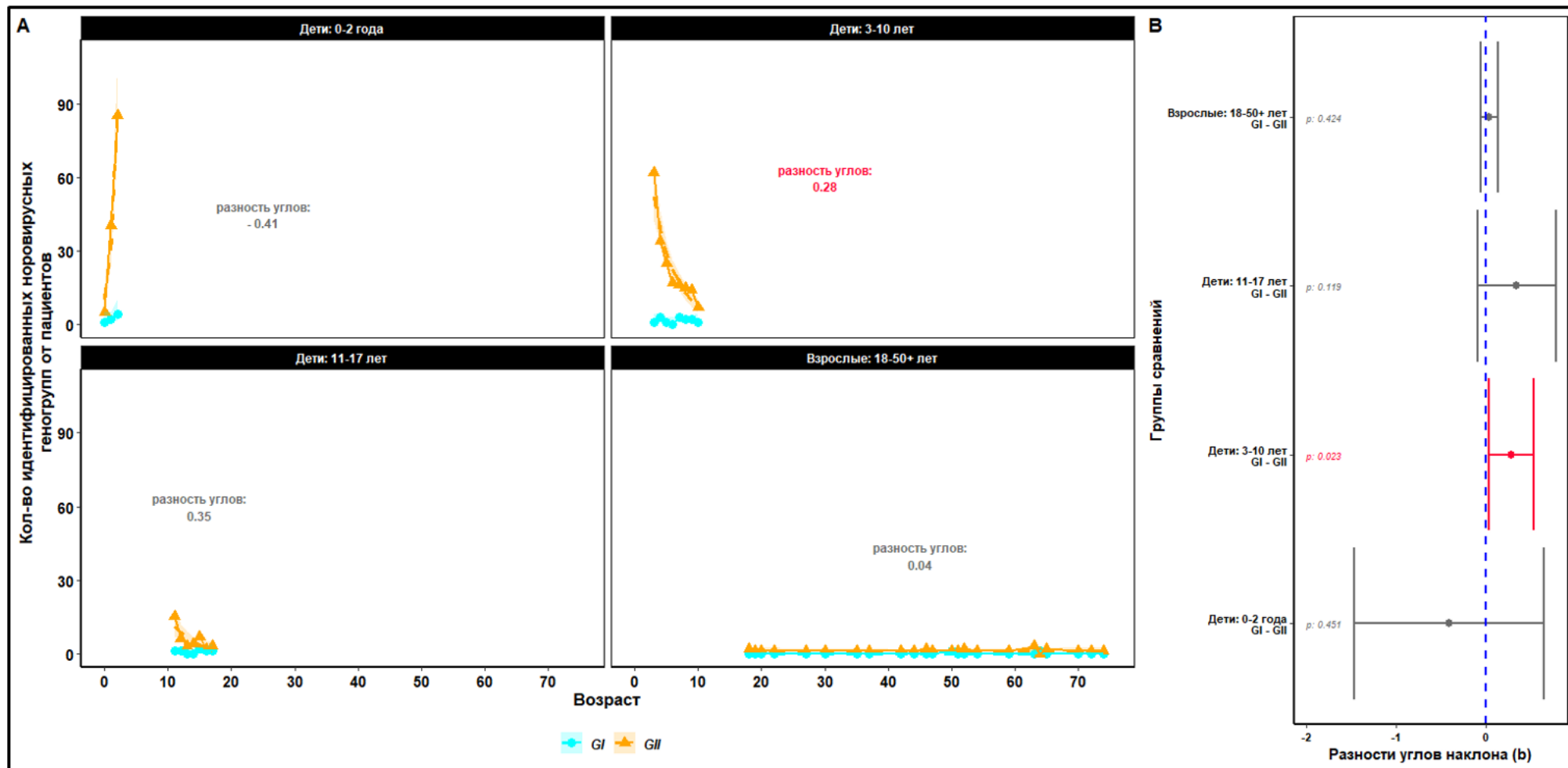


Рисунок 12. Статистически значимые различия частоты обнаружения геногрупп GI-GII при анализе разности углов наклона для разных возрастных контингентов

Проведенный анализ возрастного распределения норовирусных геногрупп GI и GII на территории Свердловской области выявил комплексную эпидемиологическую картину с выраженной возрастной специфичностью. Во всех исследуемых контингентах подтверждено доминирование геногруппы GII с максимальной частотой обнаружения в возрастной группе 3-6 лет. Особый интерес представляет выявление относительно высокой распространенности геногруппы GI в педиатрических группах (1-17 лет) и среди лиц старше 50 лет, что может быть обусловлено циркуляцией экзотических геновариантов на фоне отсутствия иммунной прослойки в человеческой популяции. Регрессионное моделирование выявило экспоненциальный рост частоты обнаружения обеих геногрупп в наиболее уязвимой группе детей 0-2 лет. Динамика распространения характеризовалась выраженным спадом в группах 3-10 лет и 11-17 лет для GII при сохранении волнообразного характера распределения для GI. В старших возрастных группах (18-50 лет и более) отмечалась относительная стабильность показателей с незначительными колебаниями. Полученные результаты подчеркивают необходимость дифференцированного подхода к эпидемиологическому надзору и профилактике норовирусной инфекции с обязательным учетом возрастных особенностей распределения геногрупп в регионе.

4.3 Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома

4.3.1 Филогенетический анализ генотипов, относящихся к геногруппе GI, идентифицированных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.

Реконструкция аддитивной филограммы демонстрирует формирование единых кластеров в отношении идентифицированных норовирусных генотипов из Свердловской области за 2022-2024 гг. Высокая степень идентичности внутри

образовавшихся кластеров GI.2, GI.3, GI.5, GI.6, GI.7 обусловлена наименьшей генетической дистанцией между сравниваемыми нуклеотидными последовательностями геногруппы GI (Рисунок 13). Идентифицированные нуклеотидные последовательности геногруппы GI моделируют образование пара- и полифилетических связей между последовательностями из Японии, Китая, России, Бразилии, Новой Зеландии, что подтверждает убиквитарность распространения выявленных норовирусов [45]. Некоторые отмеченные клады формируют терминальные узлы с наиболее дивергентными норовирусными генотипами, выявленными на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области, такими как GI.3/1010/22 из г. Екатеринбург, GI.3/3039/22 из г. Каменск-Уральский, GI.6[P11]/822/24 из г. Екатеринбург, GI.2[P2] из г. Каменск-Уральский. При проведении анализа матрицы генетической дистанции аминокислотных последовательностей (p-matrix amino acid) у наиболее дивергентных генотипов геногруппы GI из Свердловской области были определены следующие процентные значения дивергенции: для GI.3/1010/22 – 9%, для GI.3/3039/22 – 9%, для GI.6[P11]/822/24 – 5%, для GI.2[P2]/1873/24 – 8%. Влияние однонаправленного действия движущих сил дивергентной эволюции привело к возникновению большего процента генетической дистанции между исследованными последовательностями GI посредством образования миссенс-мутаций в полипептидной цепи фрагмента VP1/RdRp.

Генотипы GI.3/1010/22 из г. Екатеринбург и GI.3/3039/22 из г. Каменск-Уральский генерируют обособленные внутренние узлы и кластеризуются отдельно от смежных генотипов GI.3 из Екатеринбурга. Формированию кумуляции миссенс-мутаций в пределах изучаемого фрагмента полипептидной цепи VP1/RdRp (513 п.н.), возможно, способствовало явление репродуктивной изоляции норовирусов GI.3 [56]. В исследовании Ш. Чуньчиу проведен молекулярно-генетический анализ норовирусов в Тайване, где генотип GI.3 явился этиологическим агентом подавляющего большинства вспышек групповой заболеваемости в период 2015-2019 гг. При построении филогенетических деревьев нуклеотидных последовательностей генов VP1/RdRp регистрировалась высокая генетическая

идентичность с генотипами GI.3 из Японии и Китая. При филогенетическом анализе дивергентных GI.3 из Свердловской области также наблюдается создание полифилетических связей между последовательностями из Китая и Японии, что косвенно утверждает о наличии гипотетического общего предка.

При построении аддитивной филограммы последовательность генотипа GI.3[P10] из Испании демонстрирует наименьшее генетическое расстояние по отношению к дивергентному генотипу GI.3/3039/22 из г. Каменск-Уральский. Матрица генетических расстояний между аминокислотными последовательностями GI.3 из Свердловской области и Испании выявила 0 % дивергенции, что указывает на их полную идентичность в рамках изучаемого фрагмента VP1/RdRp, что, вероятно, свидетельствует об общем происхождении, а также потенциальном завозе испанского геноварианта GI.3 на территорию России в 2022 году [38, 122].

При анализе генетического разнообразия норовирусных последовательностей в Китае (2016-2019 гг.) обнаружена циркуляция девяти доминирующих генотипов, включая рекомбинантный GI.6[P11]. Последовательные аминокислотные замены в VP1 обусловили доминирующее положение генотипа в генотипическом профиле норовирусов в Пекине [71]. Обнаруженный генотип GI.6[P11]/822/24 из г. Екатеринбург обладает наименьшей генетической дистанцией с генотипами из Китая, образуя полифилетические связи с высоким процентом идентичности – 98 %. Высокая степень идентичности и наличие близкородственных связей GI.6[P11]/822/24 с генотипами из Китая также предполагает существование общего гипотетического предка или потенциальный завоз возбудителя на территорию России в период 2023-2024 гг.

Частой причиной вспышек групповой заболеваемости в Сингапуре и Китае являлся норовирус, относящийся к генотипу GI.2. Наибольший удельный вес идентифицированных норовирусов GI в генотипическом профиле Китая (1999-2011 гг.) приходился на генотип GI.2 – 24 % [169]. В Сингапуре генотип GI.2 стал ведущей причиной вспышек групповой заболеваемости [84]. При оценке филогенетических событий между генотипом GI.2[P2]/1873/24 из г. Каменск-

Уральский и генотипами GI.2 из Китая и Сингапура отмечается высокий процент идентичности – 99 %. Генетическое отличие GI.2[P2]/1873/24 от смежных нуклеотидных последовательностей GI.2 из Свердловской области обусловлено возможной репродуктивной изоляцией GI.2 при множественном пассировании в человеческой популяции, а также завозом экзотического геноварианта на территорию России из стран Восточной Азии.

Низкий процент обнаружения норовирусов GI на территории отдельных субъектов России, а также высокий процент идентичности между генотипами из стран Восточной Азии подтверждает гипотезу о специфическом географическом различии в молекулярной эпидемиологии отдельных геновариантов GI, что обязывает к проведению более тщательного эпидемиологического надзора за завозными инфекциями для отслеживания событий потенциального завоза на территорию Российской Федерации.

Таким образом, проведенный филогенетический анализ выявил ключевые особенности циркуляции норовирусов геногруппы GI в Свердловской области. Подтверждено распространение генотипов GI.2, GI.3, GI.5, GI.6, GI.7, формирующих кластеры с высокой внутригрупповой идентичностью. Также идентифицированы локально циркулирующие дивергентные генетические варианты норовирусов (GI.3/1010/22, GI.3/3039/22, GI.6[P11]/822/24, GI.2[P2]/1873/24), возникновение которых, вероятно, связано с действием движущего отбора и накоплением миссенс-мутаций в условиях частичной репродуктивной изоляции. Наиболее значимым результатом является филогеографическое свидетельство возможных завозных событий, где регистрируется аминокислотная идентичность генотипа GI.3 из Каменск-Уральского с норовирусным генотипом из Испании, а также высокая степень идентичности GI.6[P11] и GI.2[P2] с вариантами из Китая и Сингапура. Это подтверждает гипотезу о потенциальных завозных случаях инфицирования генотипами GI и подчеркивает процессы интродукции генетических вариантов GI.

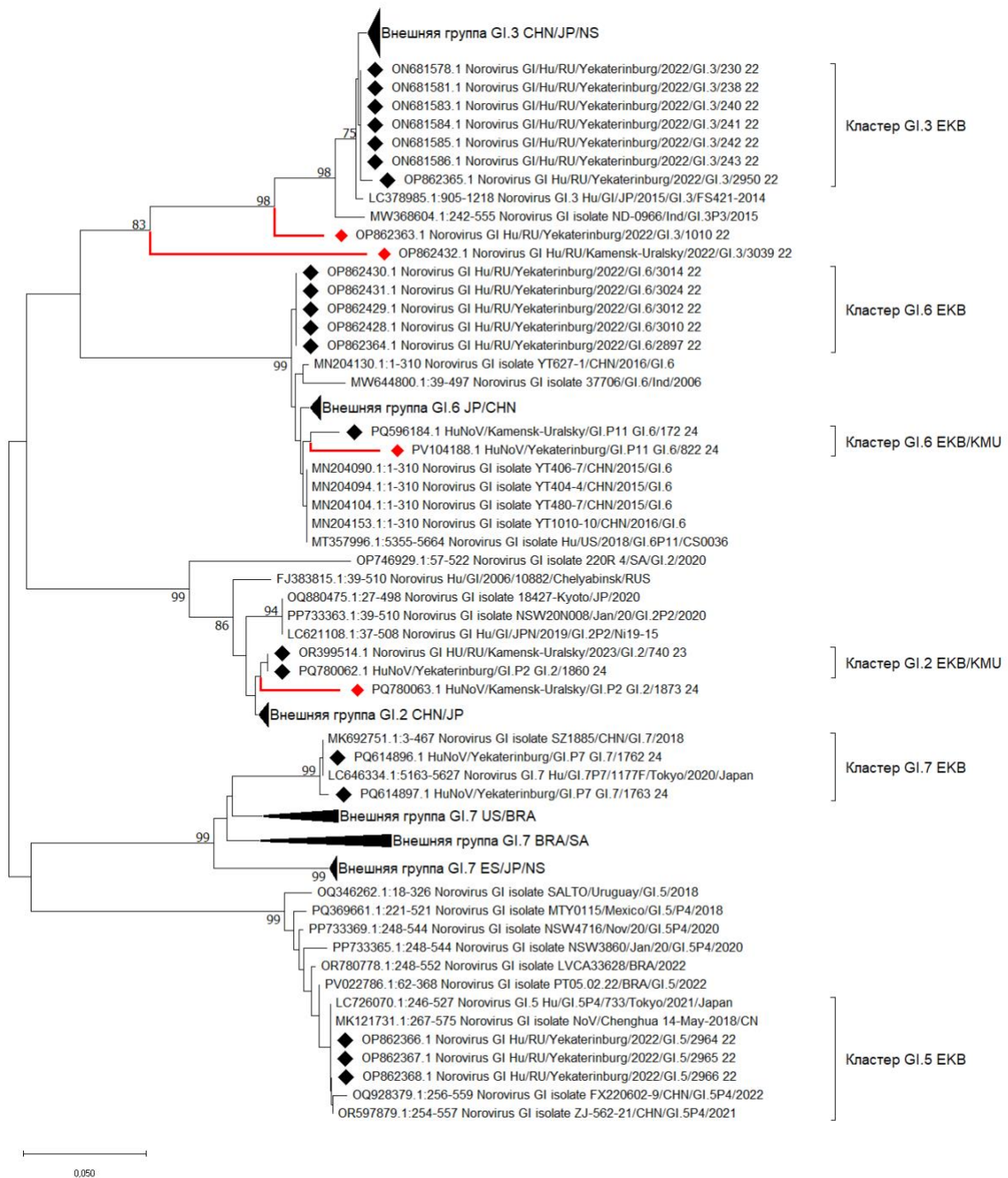


Рисунок 13. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипов GI.2[P2], GI.3, GI.5, GI.6[P11], GI.7[P7] за 2022-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской области, красным ромбом – дивергентные генотипы из Свердловской области)

4.3.2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей норовирусов, относящихся к геногруппе GII, идентифицированных на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.

При анализе аддитивной филограммы с идентифицированными генотипами GII.4[P16] из Свердловской области наблюдается формирование общего внутреннего узла с построением близкородственных филогенетических связей между последовательностями из Каменск-Уральского и Екатеринбурга. За анализируемый период 2022-2024 гг. (Рисунок 14) на территории Свердловской области подавляющее большинство последовательностей капсидных и полимеразных типов GII.4[P16] не претерпели существенных эволюционных изменений в полипептидной цепи. Топология филогенетического дерева нуклеотидных последовательностей GII.4[P16] представлена обособленными терминальными узлами, которые часто локализуются отдельно, не образуя общих кластеров. Подобные топологические особенности аддитивной филограммы могут быть распознаны как эволюционное явление политомии, однако это утверждение было бы ошибочным, поскольку высокая идентичность последовательностей из Свердловской области способствует искаженному представлению филогенетических событий между генотипами GII.4[P16] [127]. Важно отметить, что низкие индексы поддержки у внутренних узлов аддитивной филограммы также могут быть обусловлены слабым филогенетическим сигналом по причине высокой степени идентичности последовательностей как в исследуемой группе, так и в группе сравнения. При относительно генетически однородной выборке генотипов GII.4[P16] из Екатеринбурга определяются некоторые терминальные узлы с наиболее дивергентными нуклеотидными последовательностями, такими как GII.4[P16]/4/24 из г. Екатеринбург, GII.4[P16]/1276/24 из г. Екатеринбург, GII.4[P16]/251/24 из г. Екатеринбург. Процентные значения дивергенции у вышеописанных генотипов в сравнении со смежными GII.4[P16] из других муниципалитетов Свердловской области варьировались в пределах 8-12 %. Другие

представленные последовательности GII.4[P16] из муниципалитетов Свердловской области обладали процентными значениями идентичности в пределах 98-100 %.

Появлению нового рекомбинантного GII.4[P16] в 2016 году в разных странах способствовали множественные несинонимичные замены в ORF1, контролирующей синтез неструктурных белков репликативного цикла, а также изменения антигенных свойств посредством миссенс-мутаций в субдоменах VP1. Гипотетическим предком для GII.4[P16] явился генотип GII.2[P16], обнаруженный в 1999 году в Японии. По результатам научных исследований штамм GII.4_Sydney приобрел рекомбинантный тип полимеразы у штамма GII.P16-GII.2 в 2016 г. [83].

При построении аддитивной филограммы с генотипами GII.4[P16] из Свердловской области наблюдается тенденция к образованию парафилетических связей между последовательностями GII.4[P16] из Бразилии с высокой степенью идентичности изучаемого фрагмента VP1/RdRp – 98 %. Наименьшая генетическая дистанция последовательностей GII.4[P16] из Свердловской области и последовательностей GII.4[P16] из Бразилии, вероятно, обусловлена завозом бразильского геноварианта на территорию России в период 2016-2017 гг. В подтверждение представленной гипотезы существуют результаты рутинного молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями НВИ из Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016-2017 гг.», где в период 2012-2016 гг. не было зарегистрировано случаев заболеваемости рекомбинантным GII.4[P16], а в 2017 году отмечался незначительный процент обнаружения данного геноварианта – 1-2 % от всех исследованных генотипов.

На филограмме японские последовательности GII.4[P16], равно как и бразильские, образуют близкородственные связи с последовательностями GII.4[P16] из Свердловской области, обладая высоким процентом идентичности – 96 %. Широкое генетическое разнообразие GII.4[P16] в мире обуславливает необходимость расширения (масштабирования) системы рутинного молекулярно-генетического мониторинга НВИ в различных субъектах России для отслеживания возникновения эмерджентных норовирусов GII.4[P16].



Рисунок 14. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GII.4[P16] за 2023-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл.)

Исследование филогенетических событий в исследуемой группе норовирусов GII.7[P7] из Свердловской области регистрирует формирование единого кластера с высоким индексом поддержки (Рисунок 15). Анализ матрицы генетической дистанции аминокислотных последовательностей между генотипами GII.7[P7] из г. Екатеринбург, г. Ирбит, г. Каменск-Уральский демонстрирует

наименьшее генетическое расстояние, варьирующееся в пределах 0-2 %. На аддитивной филограмме кластер генотипов GII.7[P7] из Свердловской области образует обособленный внутренний узел, отделяющий кладу с последовательностями GII.7[P7] из внешней группы. Возникновение обособленного внутреннего узла генотипов GII.7[P7] из Свердловской области обусловлено наличием наибольшей генетической дистанции по отношению к кладе с генотипами GII.7[P7] из Бразилии, Индонезии, Индии, Аргентины, Японии, Южной Африки и Испании. Процентные значения дивергенции варьируют в пределах 5-29 %. Кластер GII.7[P7] с генотипами GII.7[P7]/159/24, GII.7[P7]/154/24 из г. Каменск-Уральский генерирует изолированную кладу с наиболее дивергентными таксонами, где процентные значения дивергенции составляют 37 %.

Нуклеотидные последовательности генотипа GII.7[P7] образуют монофилетическую группу с нуклеотидными последовательностями из Хабаровска и Нижнего Новгорода, идентифицированными в период 2023-2024 гг., при этом процент идентичности между ними составляет 97-99 %. Сложившиеся филогенетические отношения свидетельствуют о циркуляции норовирусов генотипа GII.7[P7], возможно относящихся к одной эволюционной линии. При этом у нуклеотидных последовательностей генотипа GII.7[P7] из Свердловской области регистрируется сопоставимый процент идентичности с последовательностями из Нижнего Новгорода, идентифицированными в 2019 году. Для трактовки причин сформировавшихся филогенетических событий необходимы данные полного гена VP1. В 2014 и 2018-2019 гг. в отдельных субъектах Российской Федерации обнаружены случаи инфицирования норовирусами GII.7[P7]. В 2023 году наблюдается рост заболеваемости норовирусами генотипа GII.7[P7] во всех субъектах России, что, вероятно, обусловлено явлениями дивергентной эволюции. Полученные данные о эволюционных событиях нуклеотидных последовательностей GII.7[P7] достоверно подтверждаются результатами филогенетического анализа.

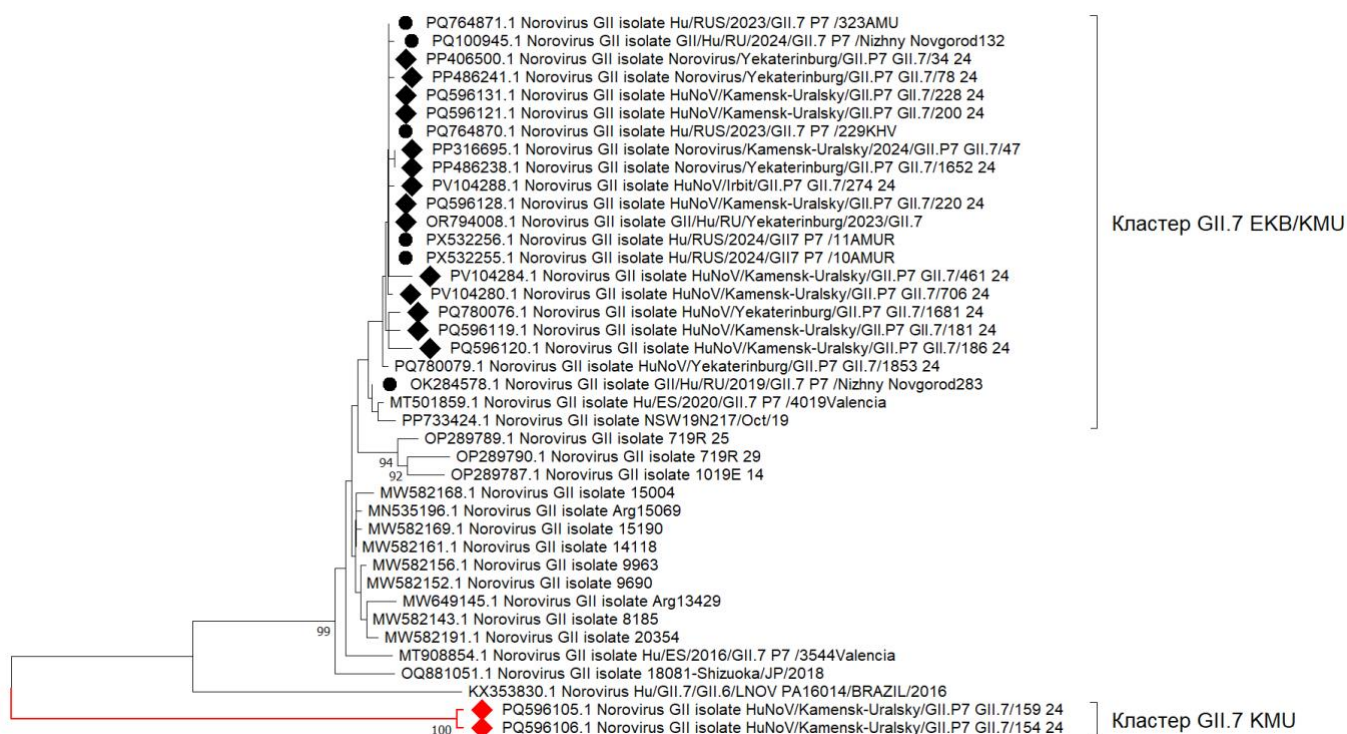


Рисунок 15. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GII.7[P7] за 2023-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл., черным кругом представлены генотипы из Нижнего Новгорода и Хабаровска)

Филогенетический анализ генотипов GII.17[P17] в отдельных муниципалитетах Свердловской области демонстрирует идентичное топологическое строение филограммы, регистрируемое у генотипов GII.7[P7], где последовательности GII.17[P17] из Свердловской области формируют обособленный внутренний узел (Рисунок 16). Идентифицированные GII.17[P17] на территории г. Екатеринбург, г. Нижний Тагил, г. Сухой Лог, г. Каменск-Уральский образуют общий кластер. За анализируемый период 2022-2024 гг. внутри образовавшегося кластера нуклеотидные последовательности GII.17[P17] не подвергались частой мутационной изменчивости, что подтверждается наименьшей генетической дистанцией между генотипами – 0-4 %. Генотипы GII.17[P17] из Свердловской области образуют полифилетические связи с нуклеотидными последовательностями из Японии, Китая, Бразилии, России, что подтверждает

повсеместное распространение выявленных норовирусных генотипов. Наибольшая генетическая дистанция обнаруживается между нуклеотидными последовательностями GII.17[P17] из Государства Бангладеш – 14 %.

Идентифицированные нуклеотидные последовательности генотипа GII.17[P17] на территории Свердловской области формируют монофилетическую группу с последовательностями GII.17[P17] из Москвы, Хабаровска и Нижнего Новгорода, при этом процент идентичности между ними составляет 99 %. Ввиду ограниченности анализируемого участка генома норовирусов, по крайней мере по результатам филогенетического анализа фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома, можно говорить о циркуляции в 2022-2024 гг. норовирусов, принадлежащих к одной эволюционной линии.

Штамм GII.17[P17] Kawasaki впервые идентифицирован на территориях Японии и Китая в 2014 году. Доминирующий в Азии штамм GII.17[P17] Kawasaki осуществил успешную интродукцию в человеческую популяцию за счет постепенной антигенной изменчивости, позволившей преодолевать популяционный иммунитет. При филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей GII.17[P17] из Свердловской области регистрируется формирование близкородственных связей с генотипами из Китая (2015 г.) и Японии (2020-2021 гг.). При рассмотрении гипотезы об общности происхождения генотипов GII.17[P17] из Свердловской области и стран Восточной Азии важно отметить наличие наименьшей генетической дистанции, которая варьирует в пределах 0-3 %, что, вероятно, обусловлено эндемичностью идентифицированных GII.17[P17] на территории Свердловской области.

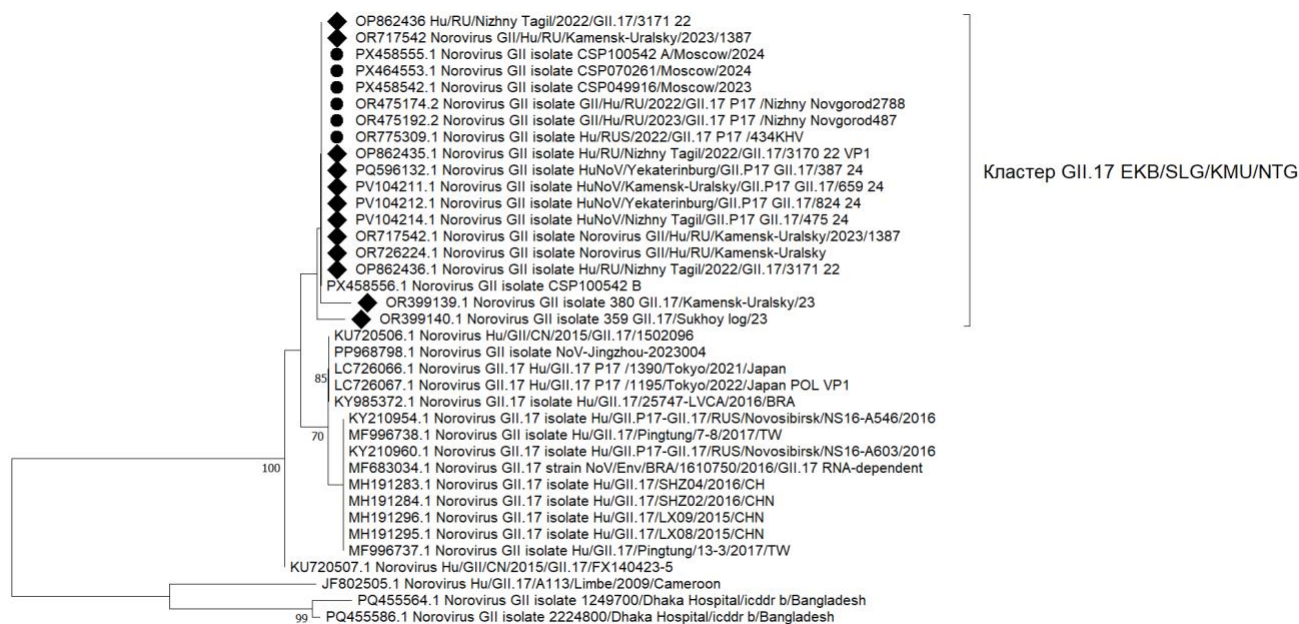


Рисунок 16. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GII.17[P17] за 2022-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл., черным кругом представлены генотипы из Нижнего Новгорода и Хабаровска)

При рассмотрении филогенетического дерева с нуклеотидными последовательностями GII.6[P7] из Свердловской области регистрируется тенденция к формированию единого кластера с высокой степенью поддержки (Рисунок 17). Внутри образовавшегося кластера из Свердловской области терминальные узлы с нуклеотидными последовательностями GII.7[P7]/1431/23 из г. Екатеринбург, GII.7[P7]/199/24 из г. Каменск-Уральский, GII.7[P7]/184/24 из г. Каменск-Уральский образуют полифилетические связи с последовательностями из Австралии и Южной Африки. Генетическое расстояние между последовательностями GII.7[P7] из Свердловской области варьирует в пределах 0-2 %. Также наблюдается формирование внутреннего обособленного узла в кладе общего гипотетического предка с дивергентным генотипом GII.6[P7]/1275/24 из г. Екатеринбург. У нуклеотидных последовательностей GII.6[P7] наблюдается формирование парафилетических связей с последовательностями из Южной Африки и Австралии, где генетическая дистанция составляет 3 %. При анализе

генетического расстояния последовательности GII.7[P7]/1275/24 между нуклеотидными последовательностями GII.6[P7] из Свердловской области регистрируется наибольший процент дивергенции – 24 %.

В исследовании Т. Такахаша при проведении молекулярно-эволюционного анализа области RdRp и гена VP1 у генотипов GII.6[P6] и GII.6[P7] обнаружено общее происхождение типов полимеразы GII.P7, GII.P6 от гипотетического предка, который возник около 50 лет назад, а у гена VP1 – 110 лет назад [146]. Темпы эволюции были выше у типа GII.P6 и гена VP1, чем у GII.P7. Также наблюдалось изменение в филогенетике после 2000 года – сайты положительной селекции в гене VP1 располагались в домене P2, связанном с изменением антигенных свойств. Важно отметить, что в гене RdRp не обнаружено ни одного сайта положительной селекции. Полученные результаты свидетельствуют о рекомбинации между GII.P6 и GII.P7-типами RdRp в геновариантах GII.6[P6] и GII.6[P7]. При рассмотрении эволюционных событий, происходящих в геноварианте GII.6[P7]/1275/24, наличие наибольшей генетической дистанции между смежными последовательностями GII.6[P7] из Свердловской области, вероятно, обусловлено явлением рекомбинационной изменчивости. В связи с накоплением высокой частоты мутационной изменчивости в гене VP1, а также формированием большого числа сайтов положительной селекции, изменяющих антигенные свойства капсида в геноварианте GII.6[P7], необходимо более тщательное ведение эпидемиологического надзора за данными генотипами в отдельных муниципалитетах Свердловской области.

Для генотипов GII.3[P12] и GII.8[P8] наблюдается формирование единого кластера с последовательностями из внешней группы. Образование парафилиетических связей между последовательностями GII.3[P12] из Испании, Китая, Японии и России обусловлено наименьшей генетической дистанцией с низкими процентными значениями дивергенции – 3 %. При анализе последовательностей GII.8[P8] из г. Екатеринбург также регистрируется возникновение близкородственных связей между таксонами из Бразилии, Северной Кореи, России, Камеруна. В связи с низким числом идентифицированных

последовательностей GII.3[P12] и GII.8[P8] не представляется возможным оценить полноту филогенетических событий во времени между другими последовательностями из Свердловской области.

Таким образом, при проведении филогенетического анализа спектра циркулирующих норовирусных генотипов в геногруппе GII на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области (2022-2024 гг.) регистрируется, что некоторое число идентифицированных последовательностей GI-GII были подвержены процессам мутационной изменчивости.

Проведенный филогенетический анализ норовирусов Свердловской области за 2022-2024 гг. раскрыл эволюционную динамику циркулирующих генотипов. В геногруппе GII обнаружены следующие эволюционные паттерны. Генотип GII.4[P16] образует генетически однородную группу с наличием отдельных дивергентных вариантов, что может свидетельствовать о продолжающейся микроэволюции внутри данной линии. Генотип GII.7[P7] формирует обособленный кластер с минимальной эволюционной дистанцией, указывая на его относительную генетическую изоляцию от других циркулирующих вариантов. В свою очередь, генотип GII.17[P17] демонстрирует высокую стабильность при сохранении филогенетических связей с восточноазиатскими последовательностями, что подтверждает его длительное закрепление в популяции и возможное периодическое занесение из других регионов. Полученные данные согласуются с современными представлениями о молекулярной эволюции норовирусов, а выявленные эволюционные паттерны имеют важное прогностическое значение для оценки риска появления новых доминирующих эволюционных линий на территории региона.

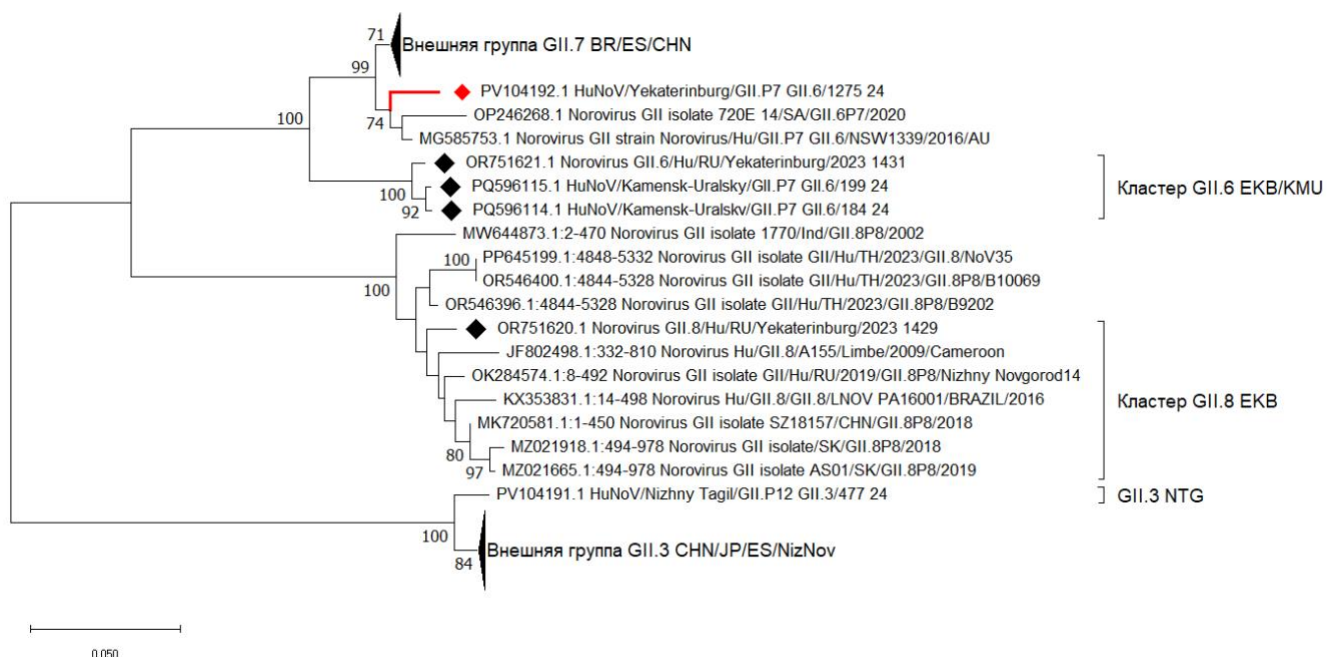


Рисунок 17. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипов GII.8[P8], GII.6[P7], GII.3[P12] за 2023-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл.; красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл.)

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о необходимости реализации системы непрерывного молекулярно-генетического мониторинга для своевременного обнаружения эмерджентных норовирусов и прогнозирования эпидемической ситуации в регионе. Выявленные особенности филогенетической структуры циркулирующих норовирусов подчеркивают важность учета как международных миграционных потоков, так и локальных эволюционных процессов при разработке противоэпидемических мероприятий. Комплексный подход, объединяющий глобальный и региональный уровни анализа, позволит более эффективно отслеживать появление новых генетических вариантов и своевременно корректировать меры профилактики.

4.4 Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента главного капсидного белка VP1 норовирусов, входящих в состав преобладающего генотипического профиля (GII.4[P16], GI.7[P7], GI.17[P17]), идентифицированных на территории Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.

Главный капсидный белок VP1 содержит ряд антигенных детерминант, опосредующих взаимодействие с нейтрализующими антителами, а также факторами прикрепления норовируса к клетке-мишени [68]. Для более углубленного анализа мутационных событий у норовирусных генотипов GI.4[P16], GI.7[P7], GI.17[P17] произведена реконструкция 3D-моделей фрагмента аминокислотных последовательностей структурного белка VP1 (Рисунок 18). С целью рассмотрения основных несинонимичных аминокислотных замен в участке VP1 были выбраны норовирусные генотипы с наибольшим количеством нуклеотидных замен, депонированных в международную базу данных GenBank NCBI.

Для генотипа GI.4[P16] проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей участка VP1, где совокупное количество последовательностей, поступивших в анализ, составило $n = 106$ (референсная последовательность полноразмерного генома, на основе которой определялись несинонимичные аминокислотные замены у последовательностей GI.4[P16] из Свердловской области – MK762570.1 Norovirus GI isolate Hu/US/2017/GI.P16-GI.4 Sydney/CS1010). По результатам множественного выравнивания аминокислотных последовательностей участка VP1 подавляющее большинство мутационных событий у последовательностей GI.4[P16] из Свердловской области относятся к синонимичным заменам, однако выявленные несинонимичные замены указывают на возможное действие положительного отбора [70, 78]. При интерпретации данных множественного выравнивания последовательности RU/SVE/GI.4[P16]/1982/2024 обнаружено три несинонимичные замены в

структуре VP1. Реконструкция 3D-модели аминокислотной последовательности образца RU/SVE/GII.4[P16]/1982/2024 демонстрирует формирование несинонимичных аминокислотных замен в сайтах, кодирующих домен S и N-терминальную часть домена S, ответственных за формирование внутренней оболочки VP1 [40]. Структурно домен S входит в состав региона C капсидного белка VP1 и является консервативным доменом среди генотипов одной и той же геногруппы [27, 40, 161]. Несмотря на консервативность домена S, выявленные мутационные замены в белке VP1 определяют приоритетную важность контроля эволюционных событий в рамках молекулярно-генетического мониторинга. Для более репрезентативной оценки эволюционных механизмов внутри генотипов необходимо секвенирование полного гена VP1.

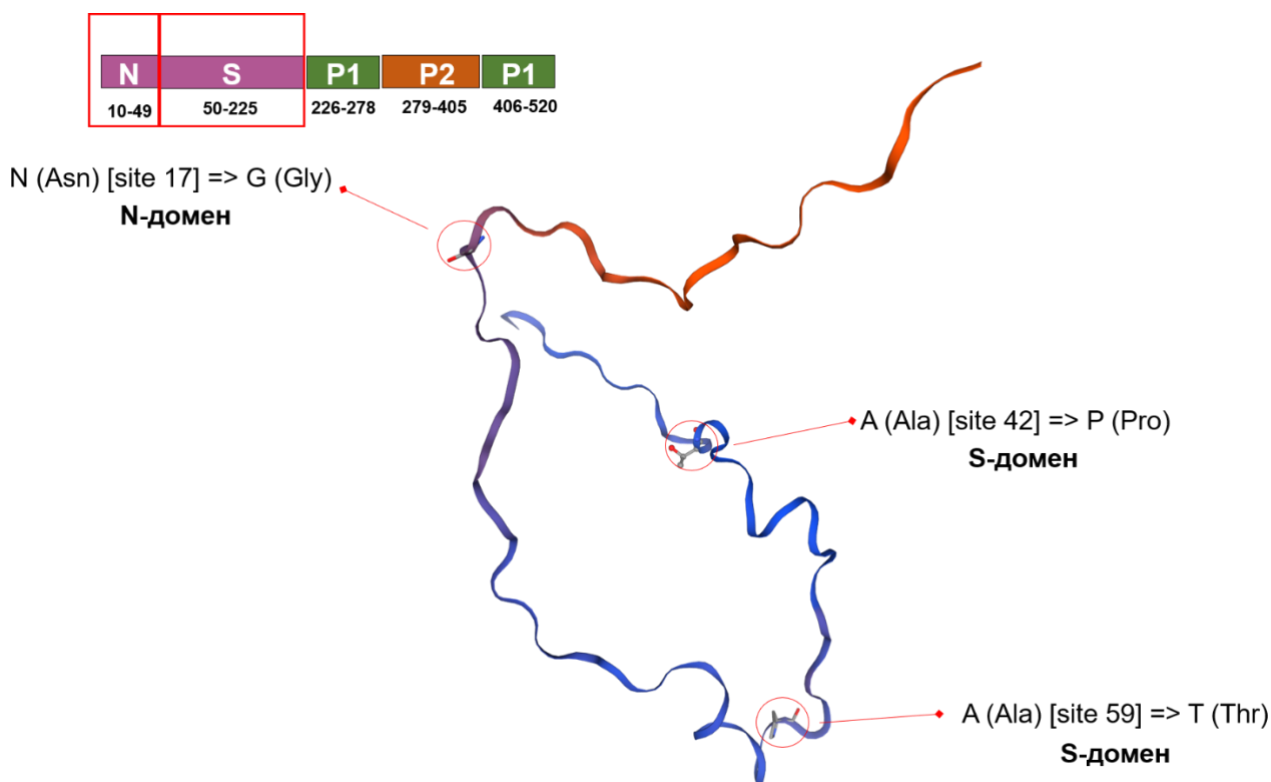


Рисунок 18. Реконструкция 3D-модели несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента структурного белка VP1 норовирусного генотипа RU/SVE/GII.4[P16]/1982/2024 из Свердловской области (3D визуализация несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

Также для генотипа GII.7[P7] проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей участка VP1, где совокупное количество последовательностей, поступивших в анализ, составило $n = 83$ (референсная последовательность полноразмерного генома, на основе которой определялись несинонимичные аминокислотные замены последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области – PQ100948.1 Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7P7/Nizhny Novgorod176). При интерпретации идентифицированных мутационных замен участка VP1 регистрируется образование синонимичных замен, не изменяющих аминокислотного состава в структуре полипептида у большинства последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области (Рисунок 19). При исследовании геноварианта RU/SVE/GII.7[P7]/90/2024 регистрируется формирование пяти несинонимичных замен в структуре аминокислотной последовательности, находящихся в сайтах, кодирующих домен S. Высокая концентрация обнаруженных мутационных замен в анализируемом участке аминокислотной последовательности, где длина фрагмента содержит 95 аминокислот, может быть обусловлена реализацией процессов репродуктивной изоляции при циркуляции данного геноварианта RU/SVE/GII.7[P7]/90/2024 в человеческой популяции. Накопление аминокислотных замен в указанном регионе может свидетельствовать об относительно обособленной циркуляции этого генотипа в пределах определённой популяции или географической территории. Такая изоляция создаёт условия для фиксации случайных мутаций и формирования уникальных генетических особенностей генотипа, что отличает его от филогенетически близких вариантов, циркулирующих в других регионах. Полученные данные подчёркивают необходимость дальнейшего изучения популяции норовирусов с учётом возможных механизмов репродуктивной изоляции, оцениваемых посредством типирования полного гена VP1, как одного из ключевых антигенных детерминант, формирующих генетическое разнообразие патогена.

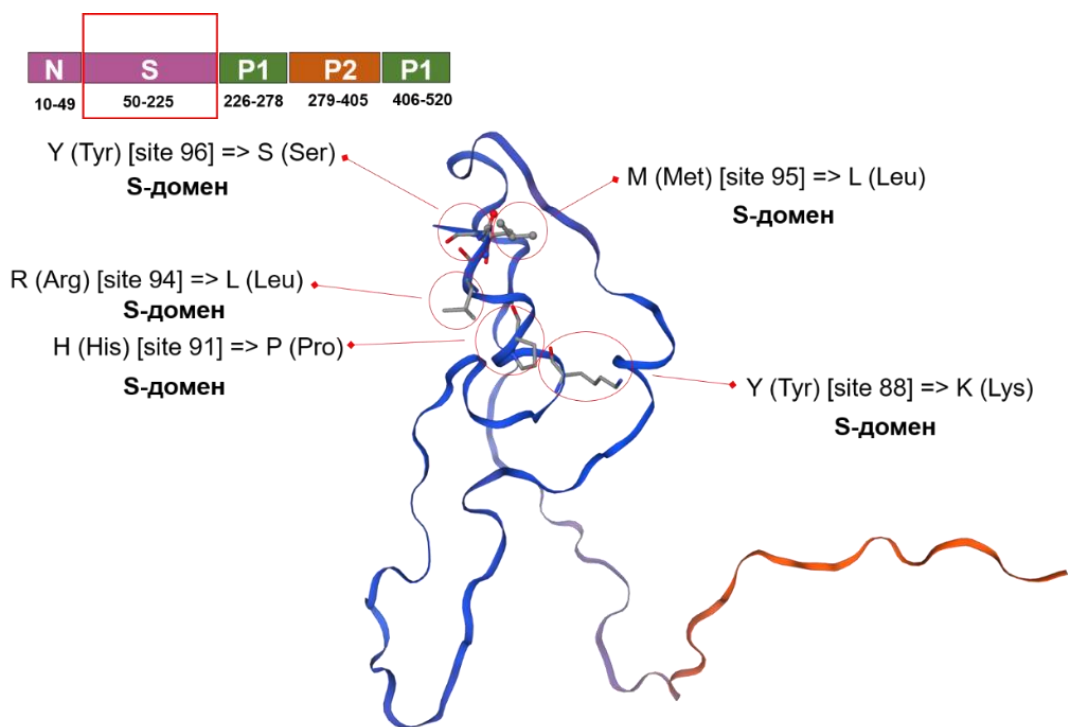


Рисунок 19. Реконструкция 3D-модели несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента структурного белка VP1 норовирусного генотипа RU/SVE/GII.7[P7]/90/2024 из Свердловской области (3D визуализация несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

Аналогичным способом проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей участка VP1 для генотипа GII.17[P17] (Рисунок 20), где совокупное количество последовательностей, поступивших в анализ, составило $n = 28$ (референсная последовательность полноразмерного генома, на основе которой определялись несинонимичные аминокислотные замены в последовательностях GII.17[P17] из Свердловской области – P/Q373139.1 Norovirus GII isolate RIVM-NL-NoV23-43 complete genome). Большинство последовательностей GII.17[P17] не имели несинонимичных замен в изученном фрагменте, обуславливающих стойкие изменения в аминокислотной структуре, что объясняется стабилизацией эволюционных процессов в вирусной популяции в регионе за 2022-2024 гг. Геновариант RU/SVE/GII.17[P17]/1380/2023 формирует одну несинонимичную замену в аминокислотной последовательности, которая находится в сайте, кодирующем S-домен.

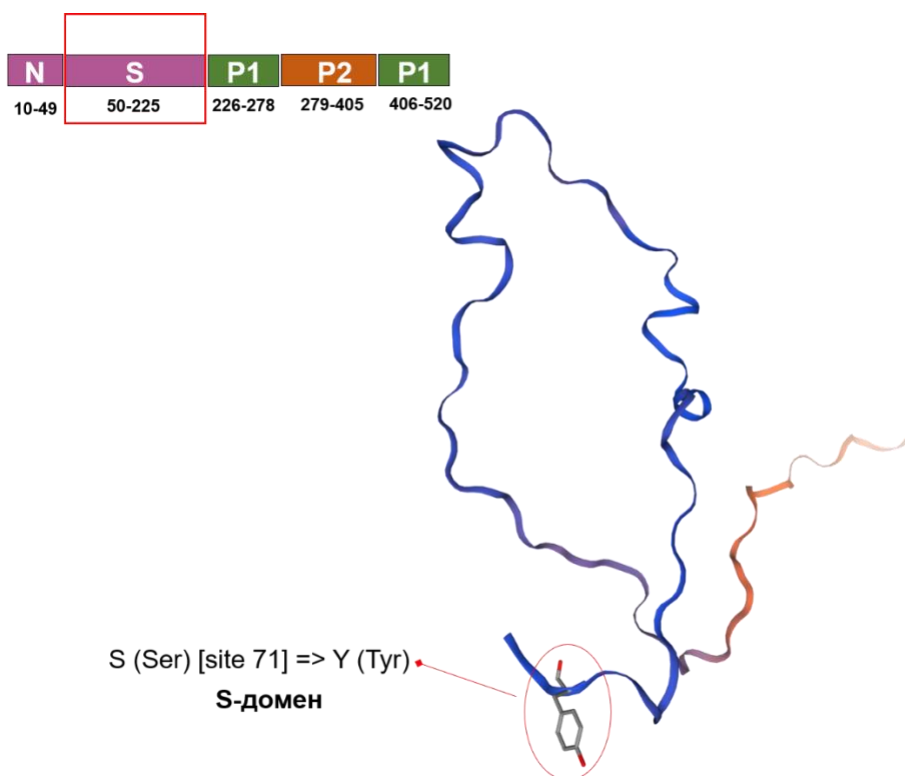


Рисунок 20. Реконструкция 3D-модели несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента структурного белка VP1 норовирусного генотипа RU/SVE/GII.17[P17]/1380/2023 из Свердловской области (3D визуализация несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

Таким образом, полученные результаты анализа мутационных событий во фрагменте главного капсидного белка VP1 норовирусных генотипов, циркулировавших в Свердловской области, выявили преобладание синонимичных замен, преобладание синонимичных замен в изученном фрагменте может свидетельствовать о его консервативности, однако наличие несинонимичных замен требует дальнейшего анализа. При этом ключевой находкой стала локализация редких несинонимичных замен в консервативном S-домене, ответственном за формирование внутренней оболочки капсида. Обнаруженные данные подчеркивают возможность встречаемости мутационных событий в консервативных регионах белка VP1, что определяет важность контроля за этими процессами в системе молекулярно-генетического мониторинга. Для углубленного понимания эволюционных механизмов требуется дальнейшее секвенирование полного гена VP1.

4.5 Идентификация полноразмерных геномов норовирусов

4.5.1 Секвенирование методом NGS нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов (full-length genomes) норовирусов GII.4, GII.7

По результатам NGS-секвенирования удалось идентифицировать 8 из 10 нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов, соответствующих двум распространённым генотипам из Свердловской области – GII.4[P16], GII.7[P7]. Анализируемые нуклеотидные последовательности были отобраны случайно из общей совокупности генотипов GII.4[P16] и GII.7[P7], идентифицированных на территории Свердловской области в 2024 году. Для случайной выборки образцов $n = 10$ проводилось определение порогового числа циклов с использованием ПЦР в реальном времени (Таблица 15). Среднее количество покрытий полного генома (median coverage) нуклеотидных последовательностей, собранных с использованием биоинформатического метода *de novo* в программном обеспечении DRAGEN v.4.3, составило 603 для GII.4[P16] и 246 для GII.7[P7]. Полученные консенсус-последовательности легли в основу последующего сравнительного филогенетического анализа и поиска потенциальных рекомбинационных событий в циркулирующих популяциях норовируса. Такой подход обеспечил возможность детекции межгенотиповых рекомбинаций, которые не могут быть выявлены при анализе изолированных фрагментов генома. Особую ценность полученные данные имеют для идентификации рекомбинантных форм, возникающих между различными генотипами геногруппы GII.

Таблица 15. Результаты определения порогового числа циклов при использовании ПЦР в реальном времени (тест-система – АмплиСенс® Норовирус GI-GII-FL, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Российская Федерация); (Цель ВКО – внутренний контрольный образец; Цель GII – геногруппа GII)

Образец	Ct ВКО (значение)	Ct GII (значение)	Ср. покрытие генома	АС номер GB
2/GII.4[P16]	28.97	14.42	1621	PV746275.1
4/GII.4[P16]	29.26	19.27	223	PV746276.1
1629/GII.4[P16]	29.48	27.67	1	–
1630/GII.4[P16]	29.95	22.06	162	PV746277.1
1987/GII.4[P16]	29.33	21.42	406	PV746278.1
28/GII.7[P7]	30.57	23.47	100	PV806172.1
29/GII.7[P7]	29.75	14.13	900	PV746280.1
30/GII.7[P7]	30.17	19.55	30	PV806173.1
31/GII.7[P7]	30.91	19.87	44	PV806174.1
38/GII.7[P7]	34.13	32.05	1	–

4.5.2 Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов (*full-length genomes*) норовирусов генотипов GII.4, GII.7, идентифицированных на территории Свердловской области в 2024 году

При реконструкции филогенетических событий нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4 топология кладограммы демонстрирует формирование двух обособленных узлов с кластерами последовательностей GII.4 из Свердловской области (Рисунок 21). Кластер с последовательностями PV746277.1 и PV746276.1 формирует полифилетические связи с последовательностями GII.4 из Нижнего Новгорода,

США и Индии. Кластер с последовательностями PV746275.1 и PV746278.1 образует полифилетические связи с кластером последовательностей из США и Японии.

На аддитивной филограмме кластеры последовательностей GII.4 из Свердловской области формируют терминальные узлы с разной скоростью эволюционных событий (Рисунок 22). Внутригенотипическая дивергенция аминокислотных последовательностей GII.4 составила 1-2 %, а дивергенция с образцами из других регионов России и зарубежных стран – 3-5 %.

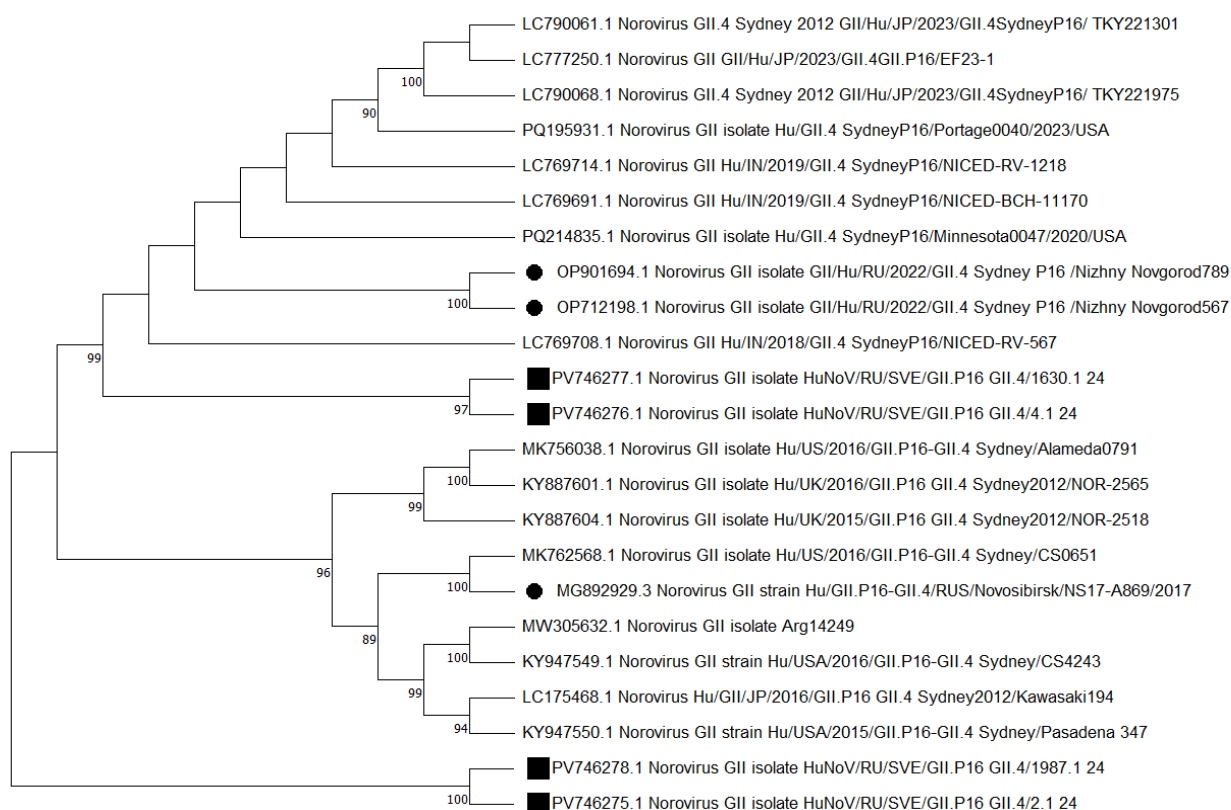


Рисунок 21. Кладограмма нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4 (черный квадрат – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территории Свердловской области в 2024 г.; черный круг – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территориях других областей России за разные аналитические периоды)

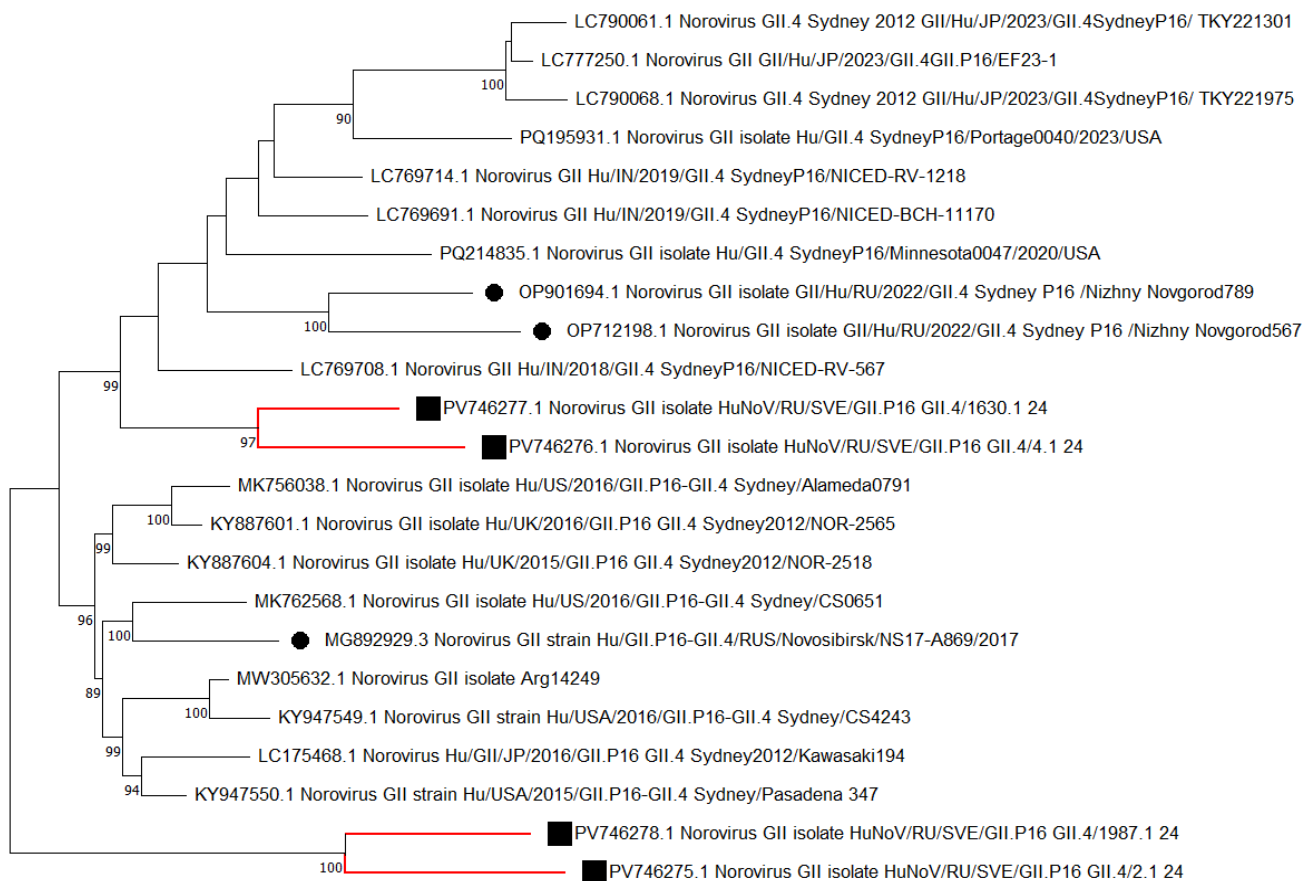


Рисунок 22. Аддитивная филограмма нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4 (черный квадрат – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территории Свердловской области в 2024 г.; черный круг – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территориях других областей России за разные аналитические периоды)

При реконструкции филогенетических событий нуклеотидных последовательностей полноразмерного генома норовирусов GII.7[P7] регистрируется образование внутренней клады с гипотетическим общим предком у последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области и Нижнего Новгорода (Рисунок 23). Последовательности GII.7[P7] из Свердловской области, образующие общий кластер с последовательностями из Нижнего Новгорода, также формируют полифилетические связи с последовательностями из Японии. Генетическая дистанция аминокислотных последовательностей образцов из Свердловской области между актуальными последовательностями из Нижнего Новгорода и Японии, идентифицированными в постковидный период, составляет 1-2 %. Генетическая дистанция аминокислотных последовательностей образцов из

Свердловской области между последовательностями GII.7[P7], обнаруженными в доковидный период, варьирует в пределах 16-18 % дивергенции.

При анализе топологии кладограммы наблюдается формирование обособленной внутренней клады с терминальным узлом у последовательности PV746280.1. При построении матрицы генетической дистанции выявленная последовательность PV746280.1 демонстрирует наибольшее генетическое расстояние аминокислотных последовательностей по отношению к смежным последовательностям GII.7[P7] из Свердловской области (24-25 % дивергенции)

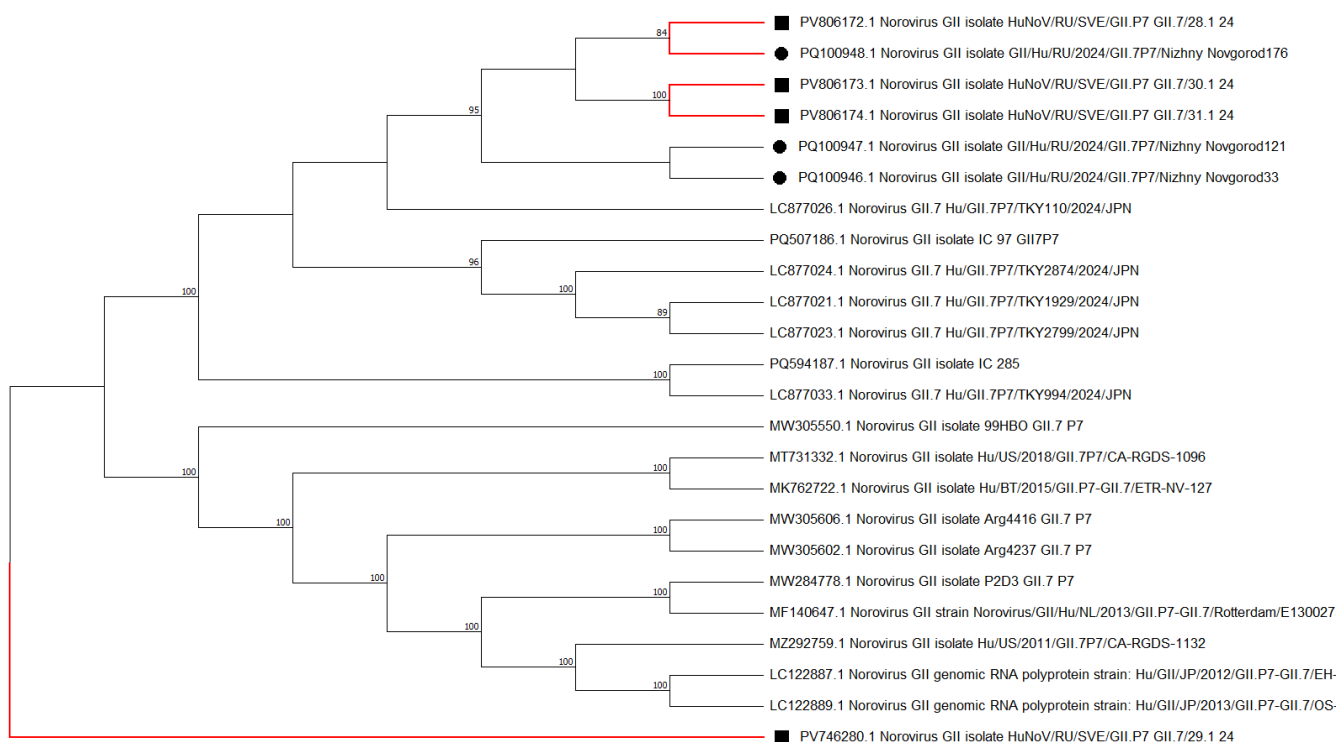


Рисунок 23. Кладограмма нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.7 (черный квадрат – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.7, идентифицированные на территории Свердловской области в 2024 г.; черный круг – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.7, идентифицированные на территориях других областей России за 2024 год)

У последовательностей GII.4[P16] из Свердловской области выявлены два независимых кластера с полифилетическими связями (связи с Нижним Новгородом, США, Индией, Японией). Низкие значения генетической дистанции (1-2 % внутри региона, 3-5 % с внешними образцами) подтверждают глобальную циркуляцию данного генетического варианта.

Для GII.7 выявлена отдельная клада, объединяющая последовательности из Свердловской области и Нижнего Новгорода, а также полифилетические связи с японскими последовательностями. Ключевой результат – последовательность PV746280.1 с высокой дистанцией (24-35 %), указывающая на уникальное указывающая эволюционное событие или отдельную линию интродукции.

4.6 Реконструкция 3D-моделей антигенных детерминант главного капсидного белка VP1

4.6.1 Исследование несинонимичных замен в последовательностях полноразмерного гена VP1 у генотипов GII.4[P16], GII.7[P7]

Анализ 3D-моделей капсидного белка VP1 генотипов GII.4 выявил несинонимичные замены в сайтах антигенных детерминант, участвующих в рецепторном эндоцитозе, а также в процессах иммунного ответа. 3D-моделирование VP1 у генотипов GII.4 показало аминокислотные замены в ключевых антигенных сайтах, ответственных за связывание с рецептором и эндоцитоз (Рисунок 24). У обнаруженных последовательностей GII.4[P16] определялись замены в аминокислотных сайтах (H (His) [site 297] = R (Arg)), кодирующих эпитоп А, который отвечает за конформацию главного капсидного белка VP1 и является антигенным эпитопом, распознаваемым нейтрализующими антителами. Также идентифицированные аминокислотные замены (H (His) [site 297] = R (Arg), N (Asn) [site 372] = D (Asp), V (Val) [site 317] = I (Ile)) обнаружены в аминокислотных сайтах, соответствующих субдомену Р2 главного капсидного белка VP1, который участвует в пенетрации вириона в клетку-мишень и взаимодействии с антигенными детерминантами комплекса HBGAs. Аминокислотная замена в сайте V (Val) [site 47] = I (Ile) располагается в участке, кодирующем домен N/S, ответственного за формирование оболочки VP1 (референсные последовательности полноразмерных геномов, на основе которых определялись несинонимичные аминокислотные замены у последовательностей

ГП.4[P16] из Свердловской области: PQ214835.1; PQ195931.1; OP901694.1; OP712198.1; MW305632.1; MK762568.1; MK756038.1; MG892929.3; LC790068.1; LC790061.1; LC777250.1; LC769714.1; LC769708.1; LC769691.1; LC175468.1; KY947550.1; KY947549.1; KY887604.1; KY887601.1).

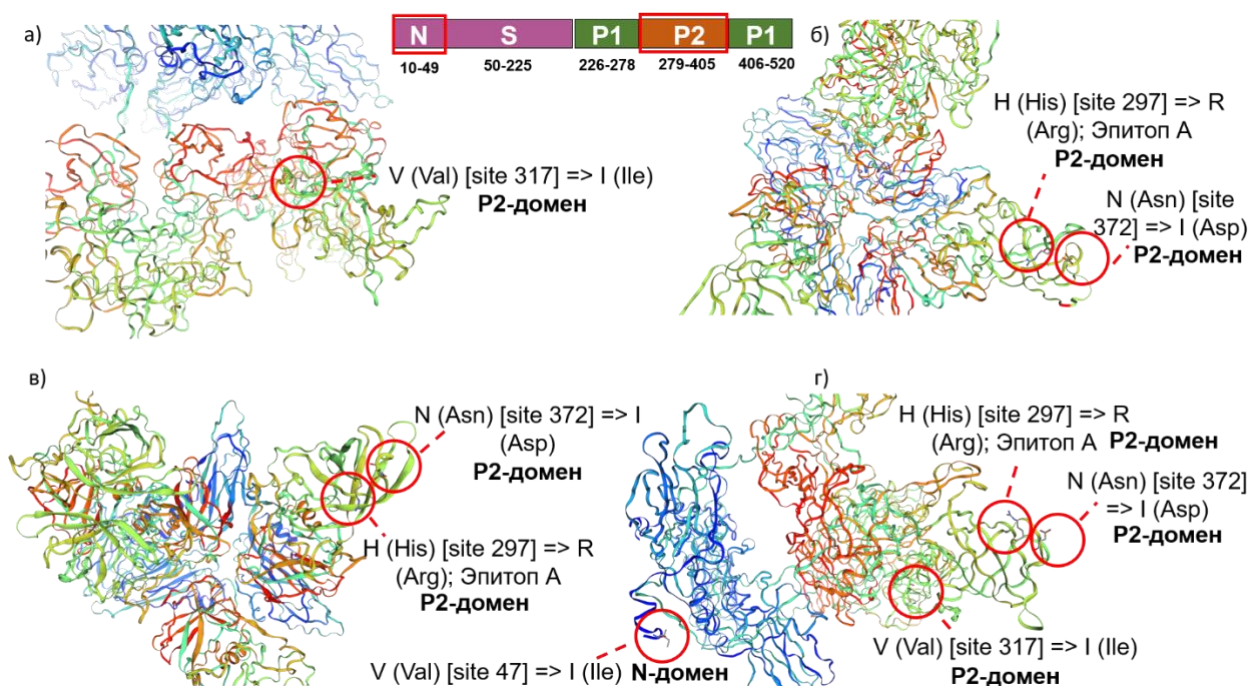


Рисунок 24. Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях главного структурного белка VP1 норовирусов ГП.4 из Свердловской области (а. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/ГП.4[P16]/2/2024; б. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/ГП.4[P16]/4/2024; в. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/ГП.4[P16]/1630/2024; г. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/ГП.4[P16]/1987/2024; 3D визуализация синонимичных/несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

У двух последовательностей ГП.7[P7] из Свердловской области при 3D-моделировании VP1 выявлены две несинонимичные замены (Рисунок 25). У последовательности PV806172.1 регистрируется замена в сайте, кодирующем P1 домен в регионе D структурного белка VP1 – М (Met) [site 237] = К (Lys), у последовательности PV806173.1 обнаружена замена в сайте, кодирующем внутреннюю оболочку VP1 – G (Gly) [site 171] = S (Ser) (референсные последовательности полноразмерных геномов, на основе которых определялись

несинонимичные аминокислотные замены в генотипах GII.7[P7] из Свердловской области: PQ100947.1; PQ100948.1; LC877021.1; LC877023.1; PQ100946.1; LC877024.1; PQ507186.1; LC877026.1; PQ594187.1; LC877033.1; MW305550.1; MW305606.1; MW305602.1; MZ292759.1; LC122887.1; LC122889.1; MW284778.1; MF140647.1; MT731332.1; MK762722.1).

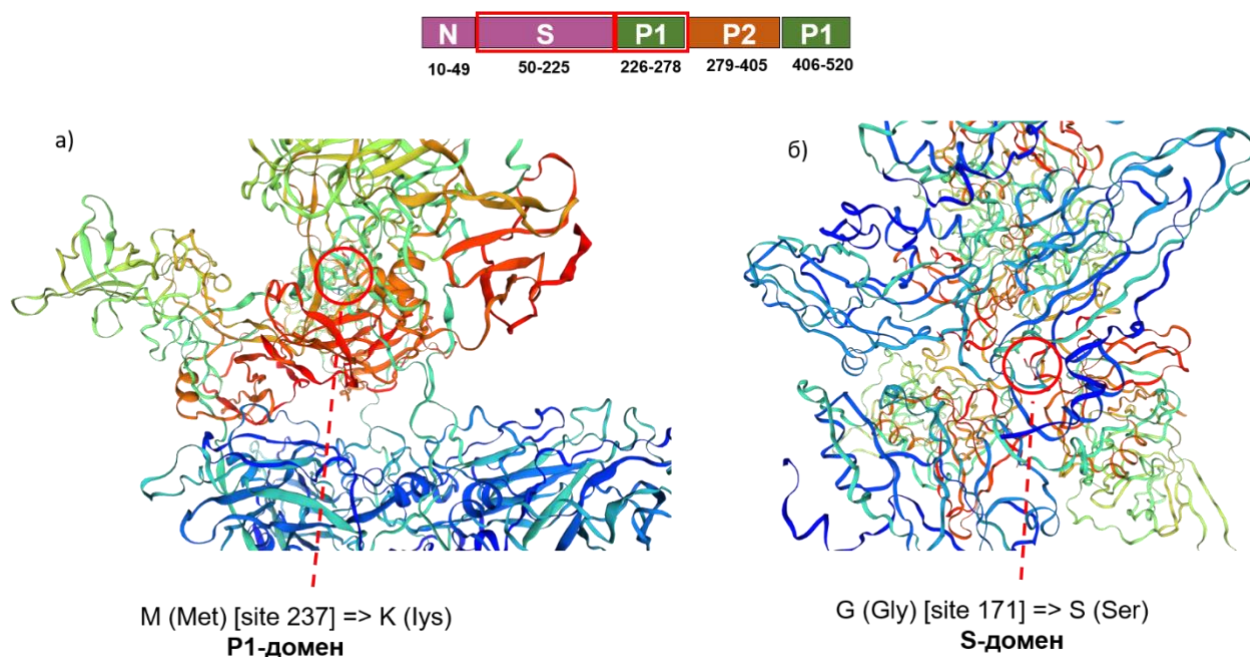


Рисунок 25. Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях главного структурного белка VP1 норовирусов GII.7 из Свердловской области (а. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.7[P7]/28/2024; б. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.7[P7]/30/2024; 3D визуализация синонимичных/несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

Таким образом, результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4[P16] и GII.7[P7] демонстрируют сопоставимые данные филогенетических событий, выявленных при филогенетическом анализе фрагментов ORF1/ORF2 норовирусного генома. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4[P16] указывает на формирование наименьшей генетической дистанции между последовательностями из Свердловской области и зарубежными последовательностями GII.4[P16] – 95-97 % идентичности. При

более детальном рассмотрении аминокислотных последовательностей генотипов GII.4[P16] из Свердловской области определен ряд мутационных замен, возможно обусловленных движущими силами дивергентной эволюции, а также географическими особенностями циркуляции. Высокий процент идентичности между свердловскими последовательностями и зарубежными последовательностями является основанием для подтверждения данных о повсеместной циркуляции данного геноварианта GII.4[P16].

По результатам филогенетического анализа норовирусов GII.7[P7] наблюдается высокая степень идентичности с последовательностями из Нижнего Новгорода и Японии, где процент идентичности составляет 98-99 %. Важно отметить, что наименьшая генетическая дистанция со свердловскими последовательностями наблюдается у зарубежных последовательностей, идентифицированных в постковидный период 2022-2024 гг. Сравнение генетических расстояний аминокислотных последовательностей образцов из Свердловской области с зарубежными последовательностями, идентифицированными в доковидный период, указывает на увеличение процента дивергенции, достигающее 16-18 %. Последовательность GII.7[P7] PV746280.1 формирует обособленную внутреннюю кладу, где степень дивергенции между другими свердловскими последовательностями варьирует в пределах 24-35 %. Наибольшая генетическая дистанция последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области между зарубежными последовательностями, сложившаяся в рамках изучаемых эволюционных событий, возможно, является результатом движущей силы дивергентной эволюции посредством реализации процессов репродуктивной изоляции при множественном пассировании рекомбинантного GII.7[P7] в человеческой популяции [55].

Анализ результатов 3D-моделей несинонимичных аминокислотных замен в основных антигенных детерминантах главного капсидного белка VP1 выявил ряд мутационных замен у GII.4[P16] и GII.7[P7]. У последовательностей GII.4[P16] обнаружено около четырех значимых мутаций, не встречающихся у других зарубежных последовательностей, в том числе у некоторых российских, которые

были идентифицированы в период 2022 года. Большое число мутационных замен у последовательностей GII.4[P16] покрывают аминокислотные сайты, находящиеся в регионе D капсидного белка VP1, ответственном за осуществление эндоцитоза через связывание с рецептором клетки-мишени [18, 99]. Более пристальный мониторинг эволюционных событий региона D главного капсидного белка VP1 предоставит возможность прогнозировать возникновение вспышек групповой заболеваемости в человеческой популяции с отсутствием коллективного иммунитета [67]. Выявленные аминокислотные замены обладают первостепенной значимостью в связи с регуляцией ускользания от адаптивного иммунного ответа реактивного организма человека. Дальнейшая эволюция сформировавшихся антигенных паттернов в субдоменах связывания вириона норовируса с клеткой-мишенью неизбежно приведет к повышению уровня заболеваемости норовирусным гастроэнтеритом.

У последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области было обнаружено всего две мутационные замены, локализованные в аминокислотных сайтах, ответственных за формирование оболочки структурного белка VP1 и субдомена P1, также необходимого для реализации процесса пенетрации в клетку-мишень. Высокая идентичность последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области с последовательностями из Японии и отсутствие выраженных мутационных изменений у последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области свидетельствуют о возможном завозе рекомбинантного GII.7[P7] из Японии на территорию России.

Обнаружение аминокислотных замен в эпитопе A, известном как основной сайт ускользания от нейтрализующих антител у пандемически значимых генетических вариантов GII.4, указывает на продолжающийся антигенный дрейф данного генотипа в регионе. Проведенный анализ выявил ряд значимых мутационных паттернов у норовирусных последовательностей GII.4[P16] и GII.7[P7], идентифицированных в Свердловской области. У последовательностей GII.4[P16] идентифицирован уникальный набор из четырех несинонимичных аминокислотных замен в ключевых доменах капсидного белка VP1. Эти мутации,

локализованные в антигенном эпитопе А, субдомене Р2 и N/S домене, потенциально влияют на конформацию вириона, рецепторное связывание и способность ускользать от иммунного ответа, что может повышать эпидемический потенциал данного варианта. Несмотря на наличие уникальных замен, высокий процент генетической идентичности с зарубежными последовательностями подтверждает глобальный характер циркуляции GII.4[P16]. В отличие от этого, последовательности GII.7[P7] продемонстрировали высокую консервативность с минимальным числом мутаций и исключительное генетическое сходство с последовательностями из Японии, что указывает на вероятный завозной характер. Полученные данные подчеркивают дивергентный путь эволюции норовирусов, при котором локальная циркуляция приводит к накоплению специфических мутаций у одних генотипов (GII.4[P16]), в то время как другие (GII.7[P7]) попадают на территорию в результате единичных заносов. Мониторинг мутаций в критических участках белка VP1, особенно в регионе D, отвечающем за проникновение в клетку, является важным инструментом для прогнозирования вспышек норовирусной инфекции.

4.6.2 Анализ рекомбинационной изменчивости актуального генотипа GII.7[P7], обнаруженного на территории Свердловской области в 2024 году

Для отслеживания событий рекомбинационной изменчивости генотипов GII.7[P7] из Свердловской области проведен анализ генетической дистанции между нуклеотидными последовательностями GII.7[P7] из Нижнего Новгорода и Токио, обладающими наибольшей степенью идентичности. При получении результатов анализа генетической дистанции построена диаграмма, иллюстрирующая генетическую идентичность, достигающую 99 % на протяжении полной геномной нуклеотидной последовательности анализируемых генотипов GII.7[P7], что подтверждает ранее представленные результаты филогенетического анализа (Рисунок 26).

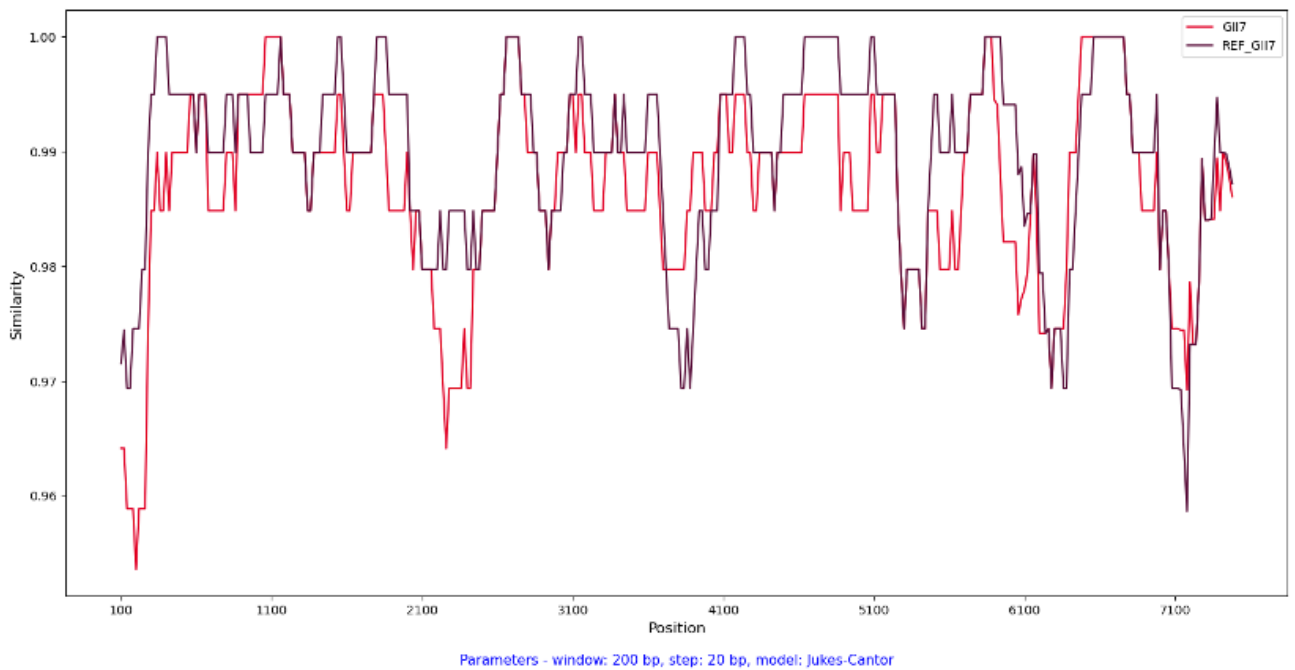


Рисунок 26. Генетическая дистанция полноразмерных нуклеотидных последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода, Токио. (Иллюстрация создана при помощи Simplot software).

Для оценки генетической дистанции между генотипами GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода и Токио построена тепловая карта генома, демонстрирующая 100% идентичность во всех анализируемых сайтах (Рисунок 27).

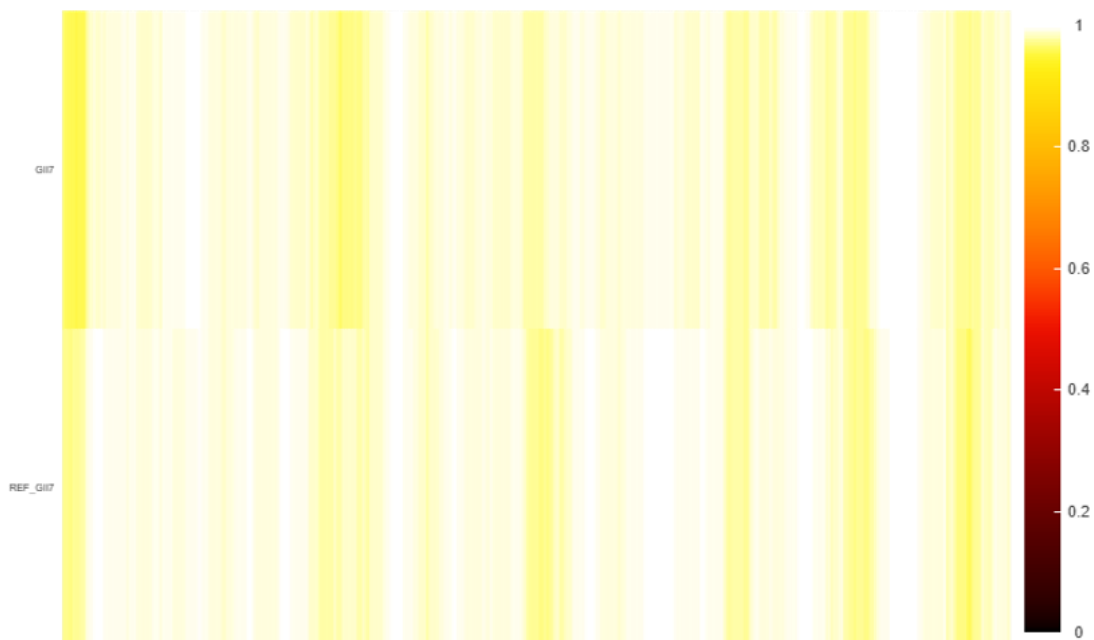


Рисунок 27. Тепловая карта генетической дистанции геномных сайтов анализируемых GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода, Токио (Иллюстрация создана при помощи Simplot software).

По результатам трех статистических критериев определена 100 % рекомбинация между японским генотипом GII.6[P7] и последовательностью GII.7[P7] из Токио, обладающими общим предком полимеразы GII.P7 (Таблица 16). Горячая точка мутационной изменчивости располагается в сайте норовирусного генома, который соответствует локализации ORF2 – VP1. Таким образом, высокая идентичность генотипов GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода и Токио подтверждает гипотезу об их завозе на территорию РФ в 2023-2024 гг.. Высокая заболеваемость в отдельных субъектах РФ обусловлена циркуляцией эмерджентного генотипа GII.7[P7] и отсутствием к нему напряженного иммунитета.

Таблица 16. Вычисление индекса попарной гомоплазии

Параметр	Значение	Интерпретация
PHI тест	$p = 0.00$	Главный критерий подтверждения событий рекомбинации
Max Chi ²	$p = 0.00$	Подтверждает рекомбинацию и находит точку обмена
Тест NSS	$p = 0.00$	Подтверждает рекомбинацию
Уровень несовместимостей	19.1%	Индикатор рекомбинации
Потенциальные рекомбинанты	Hu/GII/JP/2003/GII.P7- GII.6/ТУК-53; Hu/GII.7 /TKY2799/2024/JPN P7	Аберрантная рекомбинация между двумя генотипами
Координата обмена	5014 bp	ORF2 – главный капсидный белок VP1

Проведенный анализ рекомбинационной изменчивости позволил верифицировать рекомбинантную природу норовирусного генотипа GII.7[P7], циркулирующего в Свердловской области в 2023-2024 гг. Статистически достоверно подтверждено рекомбинационное происхождение японского генотипа GII.7[P7], причем событие рекомбинации произошло в области гена ORF2, кодирующего основной капсидный белок VP1. Продемонстрированная исключительная генетическая идентичность (99 %) между генотипами из Свердловской области, Нижнего Новгорода и Японии на всем протяжении их геномной последовательности, что способно являться убедительным молекулярно-эпидемиологическим свидетельством, подтверждающим гипотезу о недавнем заносе рекомбинантного варианта GII.7[P7] на территорию Российской Федерации в период 2023-2024 гг. Таким образом, циркуляция данного эмерджентного генотипа, к которому в человеческой популяции отсутствует адаптивный иммунитет, служит ключевым фактором, объясняющим вспышечную заболеваемость норовирусной инфекцией в указанный период.

4.7 Анализ однонуклеотидных полиморфизмов генов FUT в популяции добровольцев в Екатеринбурге за аналитический период 2024 г.

При определении генетического профиля однонуклеотидных полиморфизмов среди популяции доноров-добровольцев в городе Екатеринбурге общее количество образцов биологического материала, поступившего в исследование, составило $n = 265$. Совокупное количество идентифицированных однонуклеотидных полиморфизмов составило $n = 24$, где было обнаружено $n = 13$ клинически значимых мутаций (Таблица 17).

Для всех проанализированных SNP значение p (точный тест Фишера) превышало 0,05, что свидетельствует об отсутствии статистически значимых отклонений от равновесия Харди-Вайнберга. Данный результат подтверждает репрезентативность выборки для панмиксной популяции и отсутствие систематических ошибок генотипирования.

В рамках осуществляемого исследования анализу подлежали два биаллельных гена – FUT1 и FUT2. По данным научной литературы ген FUT1 является – геном перкурсором (precursor gene), по результатам последовательных взаимодействий с геном ABO, ответственным за экспрессию антигенов крови AB, FUT1 контролирует синтез антигена предшественника H, который при контакте с антигенами AB формируют «липкий» антиген, прикрепленный на поверхности эритроцита. В синтезе комплекса HBGAs участвуют специфические моносахариды, зависящие от аллелей гена ABO, который кодирует гликозилтрансферазы. N-ацетил-D-галактозамин является субстратом для гликозилтрансфераз типа A1 и A2, тогда как D-галактоза – для типа B. Эти сахара присоединяются к коротким олигосахаридным цепочкам, что приводит к образованию антигенов HBGAs типа A или типа B. Синтез HBGAs происходит через присоединение моносахарида к предшественнику гликана с участием гликозилтрансфераз. Например, фукозилтрансферазы, кодируемые FUT1 и FUT2, добавляют фукозу по связи $\alpha 1,2$ к конечной галактозе предшественника дисахарида, образуя H-антиген HBGAs.

В идентифицированных аминокислотных последовательностях гена FUT1 обнаружена одна миссенс-мутация с.422 G>C, приводящая к замене цистеина на серин (p.Cys141Ser). Возникновение несинонимичных замен в альфа-фукозилтрансферазе 1 может способствовать формированию несекреторного фенотипа, что в дальнейшем исключает возможность образования антигена предшественника – H, который необходим для последующего синтеза антигенных детерминант комплекса HBGAs, являющихся кофактором пенетрации норовирусного вириона в клетку-мишень [5, 125].

Таблица 17. Генетический профиль идентифицированных однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1 в г. Екатеринбурге у популяции добровольцев за аналитический период 2024 г.

SNP	FUT1
c.422 G>C, p. Cys141Ser	Миссенс-мутация
c.293 C>T, p. Thr98Met	Миссенс-мутация, фенотип «пара-Бомбей»
c.293 C>T, p. Thr98Met	Миссенс-мутация, фенотип «пара-Бомбей»
CAGAGAG>CAGAG, p.547 - 552	делеция, фенотип «пара-Бомбей»
CAGAGAG>CAGAG, p.547 - 552	делеция, фенотип «пара-Бомбей»
c.695 G>A, p.Arg*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип, фенотип «пара-Бомбей»
c.695 G>A, p.Arg*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип, фенотип «пара-Бомбей»

При изучении однонуклеотидных полиморфизмов в гене FUT2 обнаружено 7 мутационных замен. Большинство идентифицированных мутаций в гене FUT2 представлено синонимичными заменами в триплете, обусловивших формирование сайлент-мутаций в полипептидной цепи фермента альфа-фукозилтрансферазы 2. Синонимичные замены не обладают клинической значимостью в отношении формирования невосприимчивости к норовирусу по причине отсутствия конформационных изменений в полипептиде, а также невозможностью формирования несекреторного фенотипа в организме человека. Однако отсутствие изменений в аминокислотной последовательности может ввести в заблуждение, поскольку, хотя аминокислотная последовательность белка не меняется, могут измениться другие свойства, например: скорость трансляции, стабильность мРНК и конформационные свойства белка [61]. Также в гене FUT2 была определена одна миссенс-мутация в аминокислотной позиции изолейцина (с.385 A>T, p.Ile129Phe), которая последовательно заменилась на фенилаланин. Возникновение миссенс-

мутаций в гене FUT2 обуславливает остановку экспрессии основных клеточных кофакторов, а также прекращает секрецию комплекса HBGAs в биологических жидкостях организма (Таблица 18).

Таблица 18. Генетический профиль идентифицированных однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT2 в г. Екатеринбурге у популяции добровольцев за аналитический период 2024 г.

SNP	FUT2
c.624 C>T	Синонимичная замена
c.501 T>C	Синонимичная замена
c.501 T>C	Синонимичная замена
c.501 T>C	Синонимичная замена
c.501 T>C	Синонимичная замена
c.529 A>T, p.Ile177Phe	Миссенс-мутация
c.572 G>A, p.Ser*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип
c.572 G>A, p.Ser*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип
c.572 G>A, p.Ser*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип
c.572 G>A, p.Ser*	Стоп-кодон, несекреторный фенотип
c.390 C>T; c.513 C>T	Синонимичная замена
c.385 A>T, p. Ile129Phe	Миссенс-мутация
c.390 C>T	Синонимичная замена
c.390 C>T	Синонимичная замена
c.390 C>T; c.513 C>T	Синонимичная замена
c.513 C>T	Синонимичная замена
c.390 C>T	Синонимичная замена

К тому же, в гене FUT1 удалось обнаружить еще 6 клинически значимых полиморфизмов, а в гене FUT2 5 клинически значимых полиморфизмов. Однонуклеотидные полиморфизмы в гене FUT1 представлены 2 миссенс-мутациями, двумя делециями, двумя однонуклеотидными полиморфизмами, формирующими стоп-кодон в аминокислотной последовательности. Два выявленных полиморфизма образуют миссенс-мутацию в положении с.293 C>T, p. Thr98Met. Обнаруженные делеции в положении CAGAGAG>CAGAG, p.547 - 552 формируют так называемый бомбейский фенотип (полное отсутствие H-антигена), экспериментально доказано, что популяция людей с бомбейским фенотипом не способна образовывать H антиген-предшественник, что обуславливает невозможность секреции комплекса HBGAs в биологических жидкостях организма. Выявленные мутационные события в гене FUT1 также были обнаружены в популяции людей, проживающих в Республике Китай. Полученные результаты подтверждают повсеместное распространение однонуклеотидных мутаций как на территории Российской Федерации, так и на территории зарубежных стран, а также подчеркивают важность мониторинга мутационных событий в популяции людей для объективного осмысления реализации процессов генетически детерминированной резистентности к возбудителям НВИ [92]. Также два однонуклеотидных полиморфизма в положении аминокислотной последовательности с.695 G>A, p.Arg образуют стоп-кодон, что обуславливает формирование несекреторного бомбейского фенотипа. При интерпретации полученных данных о распространенности однонуклеотидных полиморфизмов в гене FUT2 удалось идентифицировать 1 миссенс-мутацию и 4 полиморфизма, образующих стоп-кодона в аминокислотной последовательности. Миссенс-мутация, не образующая стоп-кодона, находится в положении с.529 A>T, p.Ile177Phe аминокислотной последовательности. Полиморфизмы, образующие стоп-кодон в аминокислотной последовательности, формируются в положении с.572 G>A, p.Ser (Рисунок 28).

Представленные мутационные события в гене FUT2 обладают клинической значимостью, поскольку потенциально способны формировать несекреторный

фенотип и, как следствие, потенциальную полную или частичную невосприимчивость к секреторно-зависимым норовирусным генотипам. Это определяет индивидуальную восприимчивость к инфекции и имеет значение для оценки популяционного иммунитета.

При анализе распределения основных SNP генов FUT1 и FUT2 в популяции г. Екатеринбурга идентифицировано 5 мутаций, описанных в базе данных GenBank с присвоением уникальных идентификаторов. Данные полиморфизмы ранее зарегистрированы в других популяциях, что подтверждает их валидность и открывает возможности для межрегиональных сравнений. Оценка частот этих мутаций необходима для прогнозирования доли несекреторных индивидов среди жителей Екатеринбурга.

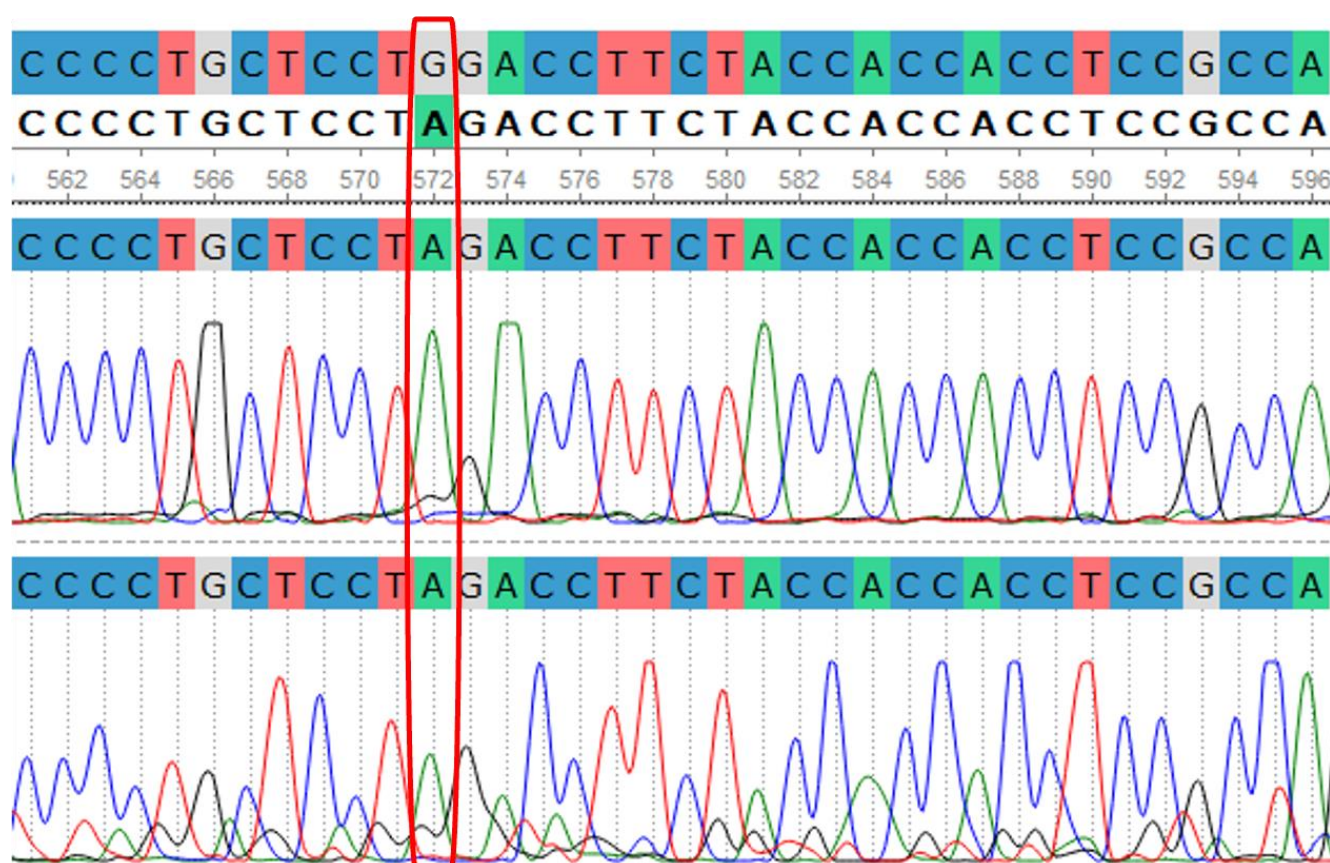


Рисунок 28. Пример хроматограммы с идентифицированным однонуклеотидным полиморфизмом, образующим несекреторный фенотип в гене FUT2

Остальные 19 выявленных мутаций не обладают уникальными идентификаторами в NCBI GenBank (Таблица 19, 19.1). Данное наблюдение свидетельствует о наличии уникальных SNP-профилей в изученной региональной популяции.

Низкая мировая частота выявленных SNP (FUT1 – 0,76%, FUT2 – 4,54%) указывает на ограниченную популяционную распространённость аллелей, связанных с резистентностью к норовирусу. Это может объяснять общую высокую восприимчивость населения России к инфекции. Для оценки функционального влияния выявленных SNP на устойчивость к норовирусу необходимы дальнейшие исследования. Перспективным направлением является углублённый анализ с применением аллель-специфичной ПЦР для точного определения гетерозиготного статуса генов FUT1/FUT2 и оценки степени экспрессии несекреторного фенотипа в популяции. Таким образом, полученные данные о низкой популяционной частоте аллелей, связанных с невосприимчивостью, создают генетическую основу для понимания эпидемиологической ситуации по норовирусной инфекции в регионе.

Таблица 19. Частота встречаемости подтвержденных мутационных событий в гене FUT 2 в мировой популяции

Тип мутации	Замена	rs	Частота
Missence	c.385 A>T, p. Ile129Phe	rs1047781	0,002
	c.529 A>T, p.Ile177Phe		0,0075
Stop codon	c.572 G>A, p.Ser	c.571C>T (R191X, rs1800028)	0,0075
Silent	c.390 C>T	rs281377	0,0094

	c.513 C>T	rs1800027	0,0057
	c.501 T>C		0,0075
	c.624 C>T		0,002

Для оценки функционального влияния выявленных SNP на устойчивость к норовирусу необходимы дальнейшие исследования. В частности, требуется подтверждение ассоциации обнаруженных мутаций с несекреторным фенотипом с использованием функциональных тестов, таких как анализ экспрессии антигенов FUT2 на поверхности эритроцитов или эпителиальных клеток. Перспективным направлением является углублённый анализ с применением аллель-специфичной ПЦР для точного определения гетерозиготного статуса генов FUT1/FUT2 и оценки степени экспрессии несекреторного фенотипа в популяции.

Таблица 19.1. Частота встречаемости подтвержденных мутационных событий в гене FUT 1 в мировой популяции

Тип мутации	Замена	rs	Частота
Missence	c.293 C>T, p. Thr98Met		0,0038
Deletion	CAGAGAG>CAGA G, p.547 - 552	c.551-552delAG rs573412368	0,0038
Stop codon	c.695 G>A, p.Arg		0.0038

Современный подход к мониторингу инфекционных заболеваний – это исследование не только особенностей циркуляции возбудителей, но и особенности восприимчивости макроорганизма человека. Изучение индивидуальной генетической изменчивости человеческой популяции для выявления основных маркеров невосприимчивости к норовирусу, получение информации о распространенности нулевых мутаций генов FUT в этнически гетерогенной группе позволит раскрыть механизмы формирования генетической невосприимчивости к норовирусу среди населения Российской Федерации, прогнозировать характер возникновения и течение заболевания у пациентов. Изучение генетической структуры популяций человека, скрининг людей с секреторно-отрицательным/секреторно-положительным фенотипом позволит своевременно выявить группы риска, которые больше всего подвержены инфицированию и проводить неспецифические профилактические мероприятия. Обнаруженные мутационные замены способны формировать полную или частичную резистентность против секреторно-зависимых норовирусных генотипов. Внедрение в молекулярно-генетический мониторинг инфекционных заболеваний анализа генетических полиморфизмов у населения России будет способствовать совершенствованию знаний в сфере профилактической медицины и повысит эффективность профилактики инфекций и инфекционного контроля.

Таким образом, проведенный скрининг однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1 и FUT2 у популяции здоровых людей Екатеринбурга выявил совокупность клинически значимых мутаций, детерминирующих формирование несекреторного статуса. В гене FUT1 идентифицированы миссенс-мутации, делеции и нонсенс-мутации, приводящие к образованию стоп-кодонов, что фенотипически проявляется как «бомбейский фенотип» и полностью исключает синтез Н-антигена-предшественника. Анализ гена FUT2 показал наличие как синонимичных замен, так и миссенс-мутаций с образованием стоп-кодонов, что также обуславливает формирование несекреторного фенотипа. Полученный спектр мутаций отражает уникальность генетического состава изученной региональной популяции. Одновременно были выявлены SNP, совпадающие с вариантами,

описанными в других популяциях, включая этнические группы Китая. Это свидетельствует о глобальном характере распространения данных полиморфизмов. Выявленные генетические варианты имеют первостепенное значение для понимания механизмов формирования генетической резистентности к норовирусной инфекции, поскольку нарушение синтеза HBGAs-антигенов, выполняющих роль ко-рецепторов проникновения вируса в клетку, создает основу для невосприимчивости к секреторно-зависимым генотипам норовируса. Дальнейший углубленный популяционный мониторинг полиморфизмов генов FUT представляется необходимым инструментом для прогнозирования рисков инфицирования и совершенствования стратегий профилактики.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование представляет собой комплексный молекулярно-эпидемиологический и эволюционный анализ норовирусов, циркулировавших на территории Свердловской области в период 2022-2024 гг. В ходе работы был применен современный методологический арсенал, включая полногеномное секвенирование методом NGS, филогенетический, рекомбинационный и популяционно-генетический анализ. Полученные результаты позволяют не только охарактеризовать актуальную эпидемическую ситуацию в регионе, но и выявить ключевые молекулярные механизмы, определяющие эволюционную динамику и эпидемиологическую значимость отдельных норовирусных генотипов. В данной главе проведена интерпретация полученных данных в контексте современных представлений о молекулярной эпидемиологии и эволюции норовирусов.

5.1 Особенности генотипического профиля и эпидемиологическая динамика норовирусной инфекции в Свердловской области

Проведенный трехлетний молекулярно-генетический мониторинг, охвативший 894 случая НВИ в десяти муниципалитетах Свердловской области, выявил сложную и динамично меняющуюся картину циркуляции норовирусов, отражающую как общемировые тенденции, так и региональную специфику. Ключевой особенностью, полностью соответствующей глобальным данным по миру, является абсолютное доминирование геногруппы GI [39], на долю которой пришлось 90% всех типированных нуклеотидных последовательностей. Наблюдаемое доминирование объясняется совокупностью факторов, включая более высокую стабильность вирионов GI в окружающей среде, эффективную передачу фекально-оральным и аэрозольным механизмами передачи, а также, возможно, более успешное взаимодействие с комплексом HBGAs населения [107, 136].

Внутренняя динамика внутри геногруппы GI в Свердловской области продемонстрировала выраженную специфику, представляя собой наглядную

модель конкурентного взаимодействия вирусных популяций. Последовательная смена доминирующих генотипов – от GII.17[P17] в 2022 году (42%) к GII.4[P16] в 2023 году (48%) и стремительному экспоненциальному росту рекомбинантного GII.7[P7] в 2024 году (40%) – отражает высокую скорость эволюционных процессов и выраженный антагонизм в отношении иммунологически наивной человеческой популяции. Представленная динамика наиболее характерна для пандемически значимых вариантов GII.4 [51, 141], однако в нашем исследовании она была инициирована генотипом GII.17[P17], что согласуется с данными о его вспышечном распространении в Азии в середине 2010-х годов и последующей глобальной экспансии [48, 67]. Снижение доли обнаружения GII.17[P17] с 42% до 6% за два года и его последующее замещение генотипом GII.7[P7] может быть объяснено прогрессивным ростом иммунной прослойки к конкретному генотипу.

Событие экспоненциального роста GII.7[P7] в 2024 году представляет особый эпидемиологический интерес. Ежегодное доминирование GII.4[P16] является ожидаемым и хорошо изученным следствием его непрерывного антигенного дрейфа и глобальной приспособленности [48], но повсеместная циркуляция относительно редкого рекомбинантного генотипа GII.7[P7] требует более детального анализа. Филогенетические данные, указывающие на практически полную идентичность – 99 % последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода и Японии, позволяют выдвинуть обоснованную гипотезу о едином источнике заноса и последующей передаче данного варианта на территорию РФ в период 2023-2024 гг. Относительно низкая доля обнаружения GII.7[P7] в 2023 году (менее 5 %) может соответствовать периоду скрытой циркуляции и адаптации.

Обнаружение в 2024 году ранее не регистрировавшихся в Свердловской области капсидных и/или полимеразных типов норовирусов, относящихся к геногруппе GI (GI.3, GI.6[P11], GI.2[P2]), филогенетически тесно связанных с последовательностями из Восточной Азии (Китай, Сингапур, Япония) [84], является еще одним подтверждением значимости завозных случаев в формировании локального генотипического профиля. Низкий общий уровень

обнаружения GI (10 %) согласуется с данными о его географическом распределении, однако появление новых геновариантов подчеркивает глобализацию эпидемического процесса и уязвимость регионов к интродукции экзотических генотипов через международные потоки.

В исследовании К. Тома проведен масштабный анализ депонированных полногеномных последовательностей норовирусов GI-GII в международной базе последовательностей GenBank NCBI, а также редко встречаемых в человеческой популяции геногрупп GVIII и GIX. Сформированная база генетических данных составила $n = 2013$ полногеномных последовательностей различных норовирусных генотипов. Совокупное количество исследованных норовирусных последовательностей было зарегистрировано в более чем 20 странах, включая Россию, Бразилию, Англию, Китай, Японию, США, Францию, Испанию, Австралию, Южную Корею, Таиланд и другие. Коллекция депонированных норовирусных последовательностей, представленная в исследовании, охватывала период от 1968 до 2023 гг. [156].

Идентифицированный генотипический профиль в исследовании К. Тома представлен преимущественно капсидными типами GII.4, GII.6, GII.17, GII.3, GII.2, что коррелирует с данными генотипического профиля, полученными на территории Свердловской области, где доминирующими капсидными типами являются GII.4 и GII.17 в разные аналитические периоды 2022-2024 гг. [156]. Основные отличия генотипического профиля из Свердловской области обусловлены широким распространением рекомбинантного GII.7[P7] и отсутствием большого числа идентифицированных капсидных типов GII.3, GII.2, GII.6, что подтверждает уникальность генотипического профиля норовирусов на территории Свердловской области на уровне сравнения с мировой тенденцией распространения лидирующих генотипов [4]. Большим распространением среди человеческой популяции отмечаются полимеразные типы геногруппы GII: GII.P31, GII.P16, GII.P7 и GII.P12 [24, 32, 41, 54, 58, 123].

При анализе частоты рекомбинационной изменчивости в области VP1/RdRp удалось обнаружить 92 события рекомбинации, которые лежали в основе

доминирования некоторых полимеразных типов. При проведении кластерного анализа одна из небольших групп включала вирусы, представляющие полимеразу GII.P6, GII.P7, GII.P8, GII.P20 и GII.P36, которые были связаны только с капсидными генотипами GII.6, GII.7, GII.8, GII.9, GII.14 или GII.20 [156]. Подавляющее большинство полимеразных типов представлено GII.P16, GII.P31, GII.P7, GII.P12 в различных странах, что также соотносится с идентифицированными полимеразными типами, обнаруженными на территории Свердловской области, которые относятся к GII.P16, GII.P7, GII.P17, за исключением GII.P31 и GII.P12, которые редко регистрировались или не регистрировались вовсе.

Генотипический профиль малораспространенных норовирусных генотипов в разных странах представлен следующим распределением: GI.3, GI.4, GI.2, GI.5, GI.6, GI.7, GI.8, GII.7, GII.12, GII.1, GII.5, GII.9, GII.13, GII.14, GII.21, GII.16, GII.27, что частично соотносится с полученным распределением генотипического профиля на территории Свердловской области, где также обнаружены капсидные генотипы GI.3, GI.5, GI.6, GI.2, GI.7, GII.7, GII.12 [4, 38, 156]. Существенным отличием генотипического профиля малораспространенных генотипов, идентифицированного на территории Свердловской области, от генотипического профиля в других странах является обнаружение высокого числа капсидных типов GII.7 и отсутствие регистрации капсидных типов GI.4, GI.8, GII.1, GII.5, GII.9, GII.13, GII.14, GII.21, GII.16, GII.27, что в совокупности подтверждает индивидуальность регистрируемой норовирусной популяции в Свердловской области за анализируемый период 2022-2024 гг.

5.2 Филогенетическая характеристика доминирующих норовирусных генотипов в Свердловской области в контексте глобальной циркуляции

Проведенный филогенетический анализ, основанный как на консервативных фрагментах (ORF1/ORF2), так и на полноразмерных норовирусных геномах,

позволил реконструировать эволюционные события и филогенетические связи циркулирующих норовирусов на территории Свердловской области.

Высокая генетическая идентичность норовирусных последовательностей генотипа GII.4[P16] (генетическая дистанция 1-2 %) и формирование близкородственных связей между кластерами с последовательностями из географически удаленных точек (Бразилия, США, Япония, другие регионы России) свидетельствуют о его активной глобальной циркуляции и недавнем распространении, минимизирующем накопление локальных мутаций [24, 59]. Представленный эволюционный сценарий является характерной чертой пандемически значимых вариантов GII.4, которые, возникая от общего предка, способны к быстрому межконтинентальному распространению и вытеснению локальных линий, что минимизирует накопление регионального генетического разнообразия на начальном этапе их циркуляции [109]. Обнаружение дивергентных генотипов (например, GII.4[P16]/4/24 с дивергенцией до 12 %) позволяет выдвинуть гипотезу о наличии локальных микроэволюционных процессов. Учитывая способность генотипа GII.4 к непрерывному антигенному дрейфу, можно предположить, что даже в условиях глобального доминирования данного генотипа возможно формирование локальных генетических вариантов под действием иммунного давления, характерного для конкретной популяции [109]. При оценке топологии филогенетического дерева регистрируется образование двух независимых кластеров, что может свидетельствовать о формировании двух независимых событий интродукции данного генотипа в Свердловском регионе.

Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генотипа GII.7[P7] на территории Свердловской области характеризуются формированием филогенетически обособленного кластера с минимальной генетической дистанцией (0-2 %). Анализируемые эволюционные процессы соответствуют гипотезе недавней интродукции и последующей быстрой экспансии вирусного генотипа в человеческой популяции.

Наиболее значимым результатом явился анализ нуклеотидной последовательности PV746280.1, которая образует отдельную внутреннюю кладу с

аномально высоким уровнем дивергенции (24-35 %) от остальных локальных GII.7[P7]. Для объяснения происхождения филогенетических событий могут быть предложены следующие гипотезы: длительная независимая циркуляция уникальной эволюционной линии в условиях эпидемиологической изоляции, независимое событие интродукции из внешнего, на данный момент не идентифицированного источника, филогенетически отличного от основного кластера, связанного с последовательностями из Японии, ускоренная эволюция в организме хозяина с нарушенным иммунным статусом, что могло привести к формированию обширного квазивидового спектра и фиксации уникальных мутаций. Выявленный генотип представляет значительный интерес как потенциальный прототип новой эволюционной линии и требует дальнейшего изучения с применением методов молекулярной филогенетики для точной датировки времени его дивергенции и реконструкции динамики распространения.

В отличие от GII.7[P7], нуклеотидные последовательности генотипа GII.17[P17], доминировавшие в 2022 году, продемонстрировали филогенетическую стабильность и ожидаемые близкородственные связи с последовательностями из Восточной Азии – региона его первоначального возникновения и вспышечного распространения в 2014-2016 гг. Его последующее стремительное вытеснение из активной циркуляции может быть объяснено комбинацией двух ключевых факторов: достижением порога популяционного иммунитета к антигенно более стабильному варианту и появлением более конкурентоспособного рекомбинантного генотипа GII.7[P7], обладающего преимуществом антигенной новизны и, как следствие, способностью к более эффективному преодолению популяционного иммунитета.

5.3 Рекомбинация как ключевой двигатель эволюции и возникновения эмерджентных норовирусов

Одним из наиболее методологически значимых результатов исследования является статистически достоверное подтверждение рекомбинационной природы

генотипа GII.7[P7]. Применение комплекса статистических критериев, чувствительных к гомоплазии (PHI-тест, Max Chi², NSS), дало однозначный результат ($p < 0,01$), выявив событие рекомбинации между близкородственным генотипом GII.6[P7] и прототипом GII.7. Критически важно, что горячая точка мутационных событий (mutational hot spot) локализована в гене ORF2 (координата 5014 п.н.), кодирующем главный капсидный белок VP1.

Данная находка имеет фундаментальное значение для понимания эволюционных механизмов норовирусов. Рекомбинация в области структурного белка представляет собой эффективный путь возникновения новых антигенных вариантов, позволяющий вирусу комбинировать капсидный ген одного генотипа GII.7 с полимеразным типом другого [P7] [115, 159]. Образовавшийся в результате рекомбинации вирус является антигенно новым для человеческой популяции, в связи с чем перекрестный иммунитет, сформированный в ответ на предыдущие инфекции, вызванные родительскими генотипами GII.6 или GII.7, может оказаться неэффективным. Стремительное распространение данного рекомбинанта в Свердловской области в 2024 году представляет собой прямое эпидемиологическое следствие этого молекулярного события.

Полученные результаты наглядно демонстрируют методологическую важность полногеномного секвенирования. Использование традиционного типирования исключительно по консервативным фрагментам генов VP1 или RdRp в подобных случаях могло бы привести к формированию неполной или методологически ошибочной картины филогенетического происхождения данного генотипа. Пренебрежение анализом рекомбинационных событий способно исказить филогенетическую реконструкцию, привести к некорректным оценкам скорости эволюции и, как следствие, к ошибочному прогнозированию эпидемиологической ситуации. Результаты исследования подчеркивают необходимость анализа на наличие рекомбинации у всех нуклеотидных последовательностей, которые могут содержаться в эмерджентных генотипах.

5.4 Мутационная изменчивость и функциональные изменения структурного белка VP1

Сравнительный анализ мутационной изменчивости выявил различные адаптивные эволюционные профили в исследуемых аминокислотных последовательностях генотипов GII.4[P16], GII.7[P7] и GII.17[P17], что отражает действие иммунного давления и естественного отбора, а не нейтральных механизмов. У норовирусного генотипа GII.4[P16] регистрируется непрерывный антигенный дрейф и адаптация репликационного комплекса. Для него характерно наибольшее количество нуклеотидных замен, распределенных как в ORF1 (RdRp), так и в ORF2 (VP1). Полногеномный анализ выявил ключевые несинонимичные замены в значимых структурных доменах белка VP1: H297R в эпитопе А, а также V317I, N372D в субдомене Р2. Эпитоп А является основным сайтом связывания нейтрализующих антител для генотипа GII.4 и основной мишенью иммунного отбора [109, 110]. Замена H297R ранее ассоциировалась с изменением антигенных свойств и потенциальным ускользанием от гуморального иммунного ответа. Замена N372D, расположенная в высоковариабельном регионе, может влиять на конформацию сайта связывания с комплексом HBGAs и электростатические взаимодействия. Накопление замен в гене RdRp может свидетельствовать об адаптации репликационного комплекса для повышения его эффективности в условиях конкретного хозяина. Таким образом, локальные генотипы GII.4[P16] демонстрируют признаки непрерывного антигенного и функционального дрейфа, что составляет основу для будущей реализации эпидемического потенциала.

Несмотря на общую генетическую идентичность норовирусных последовательностей, относящихся к генотипу GII.7[P7], свидетельствующую о недавней интродукции, были обнаружены уникальные замены: M237K в P1-домене и G171S в оболочечном домене (S-домене). P1-домен отвечает за димеризацию капсидных белков и формирование архитектурных выступов вириона. Замена метионина на лизин (M237K) может изменять локальный заряд и влиять на стабильность капсида или его аффинность к ко-рецепторам. Замена в

консервативном S-домене (G171S) регистрируется редко, так как данный домен обеспечивает структурную целостность капсида. Данные мутации, отсутствующие у референсных последовательностей из Японии, могут отражать начальные этапы адаптации рекомбинантного варианта к новым условиям (иммунному давлению, составу НВГАs в популяции) после его интродукции на территории Свердловской области в 2024 году.

Генотип GII.17[P17] продемонстрировал минимальное количество мутаций, что согласуется с концепцией его стабилизации в популяции после периода интенсивного отбора во время вспышечной заболеваемости в середине 2010-х годов. Относительно низкий уровень генетического разнообразия может также косвенно свидетельствовать о снижении его эпидемического потенциала.

Принципиально важным результатом 3D-моделирования стало обнаружение несинонимичных замен в высококонсервативном S-домене белка VP1. Этот домен отвечает за формирование внутренней оболочки капсида, и его изменения считаются эволюционно затратными ввиду потенциального нарушения сборки вириона. Их наличие у локальных генотипов указывает на то, что селективное давление может затрагивать любые участки вирусного генома. Этот факт подтверждает необходимость применения полногеномного секвенирования для более объективной оценки эволюционного потенциала циркулирующих норовирусов.

Молекулярно-генетический мониторинг, направленный на синхронное изучение эволюции антигенных эпитопов главного капсидного белка VP1 норовирусов и популяционной изменчивости генов человека FUT, кодирующих комплекс НВГАs, формирует фундаментальную основу для углубленного понимания механизмов host-специфичности. Ключевым молекулярным событием, определяющим восприимчивость к НВИ, является взаимодействие варибельной антигенной детерминанты P2 белка VP1 с полисахаридным комплексом НВГАs на поверхности клеток-мишеней. Это обстоятельство создает взаимное эволюционное давление в системе взаимодействия между вирусным патогеном и макроорганизмом человека. Со стороны вирусного возбудителя происходит отбор

вариантов, эффективно связывающих наиболее распространенные в популяции аллели НВGAs, что проявляется в дивергентной эволюции эпитопов и периодической смене доминирующих генотипов. Для организма хозяина полиморфизм генов FUT выступает в роли фактора естественного отбора, формируя генетическую предрасположенность или резистентность к определенным вирусным вариантам.

5.5 Генетическая невосприимчивость хозяина, роль полиморфизмов генов FUT

Настоящее исследование впервые на территории Уральского региона включило в молекулярно-эпидемиологический мониторинг анализ генетических факторов восприимчивости хозяина. Скрининг полиморфизмов в генах FUT1 и FUT2 у популяции здоровых жителей Екатеринбурга выявил спектр клинически значимых мутаций.

Были идентифицированы варианты, приводящие к формированию несекреторного фенотипа: миссенс-мутации (например, с.422 G>C (p.Cys141Ser) в FUT1), делеции, а также нонсенс-мутации, создающие преждевременные стоп-кодоны (например, с.695 G>A (p.Arg) в FUT1 и с.572 G>A (p.Ser) в FUT2) [65, 94, 97]. Носительство таких аллелей, особенно в гомозиготном состоянии, обуславливает нарушение синтеза НВGAs-антигенов на поверхности клеток кишечного эпителия и в секретах, что является известным механизмом генетической резистентности ко многим штаммам норовируса [89].

Внедрение такого анализа в систему эпидемиологического надзора позволит не только оценить долю генетически устойчивых лиц в популяции, но и точнее прогнозировать потенциальный масштаб вспышек групповой заболеваемости, а также идентифицировать группы риска, наиболее восприимчивые к инфекции.

Комплексность предлагаемого подхода заключается в объединении этапов формирования репрезентативной выборки, адаптации лабораторного протокола (включая градиентную ПЦР для подбора температуры отжига), молекулярно-

генетического анализа и биоинформатической обработки нуклеотидных/аминокислотных данных, что позволяет идентифицировать актуальный профиль SNP у доноров-добровольцев в городе Екатеринбурге.

Комплексный анализ ко-эволюционной динамики позволяет расшифровать молекулярные детерминанты тропности, прогнозировать эпидемиологические тенденции на основе возникающих мутаций и разрабатывать научно обоснованные стратегии управления эпидемическим процессом. Следовательно, изучение взаимной адаптации норовирусных эпитопов и рецепторного комплекса хозяина является не только ключом к пониманию барьеров передачи и популяционной динамики вируса, но и необходимым условием для перехода к предиктивной и персонализированной системе эпидемиологического надзора и контроля норовирусной инфекции.

5.6 Методологические нововведения, ограничения исследования и пути их преодоления

Разработанные и валидированные в ходе исследования оригинальные протоколы полногеномного NGS-секвенирования на основе оригинальной панели олигонуклеотидов представляют собой значимый методологический результат. Успешная реконструкция 8 из 10 полноразмерных норовирусных геномов с высоким покрытием (медианное покрытие 603x для GI.4[P16] и 246x для GI.7[P7]) из клинических образцов с умеренной вирусной нагрузкой (Ct до 27) подтверждает эффективность подхода. Ключевым преимуществом является получение полной генетической информации из единой ампликонной библиотеки, что исключает ошибки сборки, возможные при метагеномном секвенировании.

Ограничения настоящего исследования

Исследование охватило 10 крупных муниципалитетов, но не все районы Свердловской области. В будущем необходима стратифицированная выборка, включающая сельские поселения и отдельные учреждения. Отсутствие клинико-генетических корреляций: в диссертационном исследовании не анализировалась

связь генотипа вируса с тяжестью течения заболевания при носительстве несекреторного аллеля/аллелей в семействе генов FUT. Не определен предиктивный потенциал выявленных мутаций в норовирусном геноме. Функциональная роль обнаруженных аминокислотных замен (H297R, M237K и др.) демонстрируется исключительно *in silico*. Требуется экспериментальное подтверждение с использованием систем обратной генетики, псевдовирусных частиц и нейтрализационных тестов с панелью моноклональных антител и сыворотками переболевших.

5.7 Полученные результаты, практическая значимость и стратегические перспективы

Проведенное исследование позволяет сформулировать вывод о том, что эпидемическая ситуация с норовирусной инфекцией в Свердловской области в 2022-2024 гг. определялась сложным взаимодействием трех основных групп факторов: глобальных эволюционных трендов, представленных доминированием и непрерывным антигенным дрейфом пандемически значимого варианта GII.4[P16]; событий заноса и быстрой кластерной экспансии новых рекомбинантных линий, ярким примером чего стал генотип GII.7[P7], к которому отсутствовал популяционный иммунитет; локальных особенностей популяции хозяина, включая долю лиц с потенциальной генетической резистентностью, определяемой полиморфизмами генов FUT.

Практическая значимость и стратегические перспективы

Создание региональной базы данных полных геномов норовирусов. Необходимо организовать систематическое депонирование и анализ полногеномных последовательностей норовирусов Свердловской области, что станет основой для ретроспективного анализа и молекулярной эпидемиологии в реальном времени.

Внедрение алгоритма быстрого реагирования на эмерджентные норовирусы. При обнаружении нового рекомбинантного или дивергентного геноварианта

должна запускаться программа усиленного эпидемиологического расследования для определения источника, путей передачи и групп риска.

Развитие направлений функциональной вирусологии. Создание на базе выявленных локальных генотипов инфекционных клонов или псевдовиральных систем для экспериментальной оценки влияния конкретных мутаций на инфекционность, нейтрализацию и рецепторную специфичность.

Проведение масштабного популяционно-генетического исследования. Организация репрезентативного скрининга полиморфизмов генов FUT в различных федеральных округах РФ для создания карты генетической восприимчивости населения к норовирусу.

Междисциплинарный подход к разработке вакцин. Учет данных о циркулирующих в России норовирусах и их антигенных особенностях при разработке и оценке эффективности кандидатных вакцин против норовирусной инфекции.

Разработка и внедрение новых диагностических инструментов. Дальнейшая реализация молекулярно-генетического мониторинга на основе специфической амплификации участка ORF1/ORF2 и создание тест-системы для скрининга полиморфизмов генов FUT методом SNaPshot позволят оперативно выявлять вспышки, идентифицировать циркулирующие норовирусы и оценивать генетическую восприимчивость населения, что может быть внедрено в систему эпидемиологического надзора Свердловской области.

Таким образом, настоящее исследование не только дает детальную характеристику текущей эпидемиологической ситуации, но и закладывает научно-методологический фундамент для перехода от реактивного к проактивному эпидемиологическому надзору за норовирусной инфекцией в Российской Федерации, основанному на глубоком понимании молекулярной эволюции возбудителя и генетических особенностей популяции хозяина.

6. ВЫВОДЫ

- 1) Адаптированный алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов позволил сформировать репрезентативную коллекцию из 416 нуклеотидных последовательностей и впервые детально охарактеризовать циркуляцию норовирусов на территории Свердловской области за аналитический период 2022-2024 гг.
- 2) Результаты трехлетнего молекулярно-генетического мониторинга норовирусов на территории Свердловской области обеспечили надежную основу для ретроспективного и текущего анализа циркуляции возбудителя, подтвердив преобладание геногруппы GII и выявив уникальное для региона генетическое разнообразие. Установлено, что норовирусная популяция формируется преимущественно под влиянием генотипического профиля с доминирующими генотипами (GII.4[P16], GII.7[P7], GII.17[P17]), при одновременной активной циркуляции малораспространенных генотипов, часть из которых ранее не фиксировалась в регионе, что указывает на множественные независимые пути заноса инфекции.
- 3) Филогенетический анализ подтвердил, что, несмотря на высокую степень идентичности у большинства норовирусных нуклеотидных последовательностей, на территории области циркулируют высокодивергентные генотипы, доля которых составляет 10 % от всей популяции норовирусов, что может свидетельствовать об интенсивных эволюционных процессах. Филогенетический анализ полноразмерных геномов GII.4[P16] и GII.7[P7] выявил формирование филетических связей и наименьшей генетической дистанции между последовательностями из Нижнего Новгорода.
- 4) Впервые на территории УрФО методом NGS с использованием оригинальных панелей праймеров полностью охарактеризованы геномы циркулирующих норовирусов GII.4[P16] и GII.7[P7]. Для локальных генотипов установлены уникальные паттерны несинонимичных замен в антигенных детерминантах

(эпитоп А) и рецептор-связывающих доменах белка VP1. Подтверждены события рекомбинационной изменчивости у циркулирующего на территории Свердловской области норовирусного генотипа GI.7[P7]. Представленные результаты вносят значимый вклад в процессы потенциального прогноза дальнейшей динамики норовирусной инфекции в регионе.

- 5) В России впервые адаптирован и апробирован на популяции г. Екатеринбурга комплексный подход для оценки популяционной изменчивости генов FUT, позволяющий определить 13 однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1 и FUT2, ассоциированных с несекреторным фенотипом, что создаёт основу для дальнейших популяционных и ассоциативных исследований по оценке вклада генетической изменчивости хозяина в восприимчивость к норовирусной инфекции.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ABO – Антигены системы крови человека

eIF3 – Eukaryotic Initiation Factor 3, Эукариотический трансляционный фактор 3

FUT1 – Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1, Галактозид-2-альфа-фукозилтрансфераза 1

FUT2 – Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2, Галактозид-2-альфа-фукозилтрансфераза 2

HBGAs – Histo-Blood Group Antigens, Антигены группы крови человека

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, Международный комитет по таксономии вирусов

ID – Инфицирующая доза

МАРК – Mitogen-activated protein kinase, Митоген-активируемая протеинкиназа

ММlv – Обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей (ревертаза)

NCBI – National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации

NF-κB – Nuclear factor kappa B, Универсальный фактор транскрипции каппа В

NGS – Next Generation Sequencing, Секвенирование следующего поколения

NS – Nonstructural proteins, Неструктурные белки

NTPase – Nucleoside triphosphatase, Нуклеозидтрифосфатаза

ORF – Open Reading Frame, Открытая рамка считывания

PI3K/Akt – The phosphatidylinositol 3-kinase and Protein Kinase B (Akt), Фосфатидилинозитол-3-киназа и протеинкиназа В

Pro – Protease, Протеаза

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase, РНК-зависимая РНК-полимераза

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor, Растворимый рецептор присоединения к N-этилмалеимид-чувствительному фактору

SNP – Single nucleotide polymorphism, Однонуклеотидный полиморфизм

UTR – Untranslated region, Нетранслируемая область

VAMP – Vesicle Associated Membrane Protein Associated Protein A, Мембранные белки, связанные с везикулами, протеином А

VP1 – Major viral protein, Мажорный капсидный белок

VP2 – Minor viral protein, Минорный капсидный белок

VPg – Virus protein, genome-linked, Вирусный белок, связанный с геномом

ВКО – Внутренний контрольный образец

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

GI – Первая геногруппа

GII – Вторая геногруппа

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – Иммуноферментный анализ

кДНК – Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

МКБ – Международная классификация болезней

НВИ – Норовирусная инфекция человека

ОКИ – Острая кишечная инфекция

ОТ-ПЦР – Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Р-группы – Группы норовирусной полимеразы

Р-типы – Типы норовирусной полимеразы

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

РНК – Рибонуклеиновая кислот

СМП – Средний многолетний показатель

ТВЕ – Этилендиаминтетрацетат (Буфер)

ФБС – Фосфатно-солевой буферный раствор

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беделбаев М. К. Сравнительная характеристика секреторных диарей у детей раннего возраста, вызванных ротавирусом и норовирусом / М. К. Беделбаев, З. К. Джолбунова, Е. А. Халупко и др. // Кыргызской государственной медицинской академии им. И. К. Ахунбаева. — 2023. — Т. 1. — № 3.
2. Бутакова Л. В. Генотипы норовирусов, обусловившие заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Хабаровском крае / Л. В. Бутакова, Е. Ю. Сапега, О. Е. Троценко и др. // Здоровье населения и среда обитания. — 2018. — № 7. — С. 52–57.
3. Бутакова Л. В. Водная вспышка острой кишечной инфекции, обусловленная рекомбинантным норовирусом генотипа GII.P7-GII.6, в городе Хабаровске в 2019 году / Л. В. Бутакова, Е. Ю. Сапега, О. Е. Троценко и др. // Здоровье населения и среда обитания. — 2020. — № 6. — С. 50–54.
4. Быков Р. О. Анализ генетического разнообразия норовирусов (Caliciviridae, Norovirus) на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за 2022-2024 гг. / Р. О. Быков, В. И. Чалапа, Т. М. Итани и др. // Инфекционные болезни. — 2025. — Т. 1. — № 23. — С. 55–64.
5. Быков Р. О. Изучение аспектов формирования генетически детерминированной резистентности к возбудителю норовирусной инфекции посредством полиморфизма гена FUT2 / Р. О. Быков, А. В. Семенов, П. К. Старикова, Т. М. Итани // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2023. — Т. 6. — № 22. — С. 148–154.
6. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2024 году». – Москва: Роспотребнадзор, 2024. — URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21796 (дата обращения: 21.03.2024). — Текст: электронный.
7. Епифанова Н. В. Эпидемические варианты норовирусов генотипа GII.4 в Нижнем Новгороде в 2006-2012 гг. / Н. В. Епифанова, Л. Б. Луковникова, Н. А.

- Новикова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2014. — № 2. — С. 64–72.
8. Епифанова Н. В. Генетические варианты норовируса генотипа GII.6 / Н. В. Епифанова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2015. — Т. 4. — № 33. — С. 30–37.
 9. Епифанова Н. В. Генотипирование в эпидемиологическом надзоре за норовирусной инфекцией: методические рекомендации: МР 4.4/3.1.1.0230-21 / Н. В. Епифанова, Н. А. Новикова, А. Т. Подколзин, К. В. Кулешов; утв. А. Ю. Поповой 19.01.2021. — Москва, 2021.
 10. Епифанова Н. В. Рекомбинантный норовирус GII.Pg_GII.12 у детей с острой кишечной инфекцией / Н. В. Епифанова, Н. А. Новикова // Медицинский алфавит. — 2013. — Т. 12. — № 2. — С. 22–26.
 11. Караваяев В. Е. Клинико-эпидемиологическая характеристика вспышки, обусловленной норовирусом, в детском коллективе / В. Е. Караваяев, И. И. Козырева, О. Б. Яныкина и др. // Вестник Ивановской медицинской академии. — 2009. — Т. 4. — № 14. — С. 9–11.
 12. Кожухова Е. А. Характеристика случаев острой диареи у взрослых больных с позитивной реакцией клинического материала на норовирус / Е. А. Кожухова, И. В. Горбова // Инфекция и иммунитет. — 2019. — Т. 2. — № 9. — С. 375–380.
 13. Лапин В. А. Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства / В. А. Лапин, Д. В. Новиков, Е. В. Мохонова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2024. — № 5. — С. 661–667.
 14. Лапин В. А. Рекомбинантный VP1 норовируса генотипа GII.4 (Caliciviridae: Norovirus) способен индуцировать выработку перекрестно-реагирующих антител / В. А. Лапин, Д. В. Новиков, А. Ю. Кашников и др. // Вопросы вирусологии. — 2025. — Т. 3. — № 70. — С. 282–290.
 15. Сапега Е. Ю. Анализ вспышек норовирусной инфекции в организованных коллективах Амурской области в 2022 году / Е. Ю. Сапега, Е. Ю. Бутакова, Л.

- В. Бутакова и др. // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2025. — № 44. — С. 36–38.
- 16.** Ускова А. П. Роль норовирусов в структуре заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории Омской области / А. П. Ускова, В. Л. Стасенко, Е. В. Жираковская // Здоровье населения и среда обитания. — 2012. — № 3. — С. 40–43.
- 17.** Ahluwalia T. S. FUT2–ABO epistasis increases the risk of early childhood asthma and Streptococcus pneumoniae respiratory illnesses / T. S. Ahluwalia, A. U. Eliassen, A. Sevelsted et al. // Nature Communications. — 2020. — Vol. 11. — № 1. — P. 6398.
- 18.** Alvarado G. Human monoclonal antibodies that neutralize pandemic GII.4 noroviruses / G. Alvarado, K. Ettayebi, R. L. Atmar et al. // Gastroenterology. — 2018. — Vol. 155. — № 6. — P. 1898–1907.
- 19.** Ambert-Balay K. Characterization of New Recombinant Noroviruses / K. Ambert-Balay, F. Bon, F. Le Guyader et al. // Journal of Clinical Microbiology. — 2005. — Vol. 43. — № 10. — P. 5179–5186.
- 20.** Ao Y. Norovirus GII.P16/GII.2–associated gastroenteritis, China, 2016 / Y. Ao, J. Wang, H. Ling et al. // Emerging Infectious Diseases. — 2017. — Vol. 23. — № 7. — P. 1172–1175.
- 21.** Asten L. van. Unspecified gastroenteritis illness and deaths in the elderly associated with norovirus epidemics / L. van Asten, J. Siebenga, C. van den Wijngaard et al. // Epidemiology. — 2011. — Vol. 22. — № 3. — P. 336–343.
- 22.** Atmar R. L. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus / R. L. Atmar, A. R. Opekun, M. A. Gilger et al. // The Journal of Infectious Diseases. — 2014. — Vol. 209. — № 7. — P. 1016–1022.
- 23.** Bartsch S. M. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis / S. M. Bartsch, B. A. Lopman, S. Ozawa et al. // PLOS ONE. — 2016. — Vol. 11. — № 4. — P. e0151219.
- 24.** Beek J. van. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012 / J. van Beek, K. Ambert-

- Balay, N. Botteldoorn et al. // *Eurosurveillance*. — 2013. — Vol. 18. — № 1. — P. 8–9.
- 25.** Belliot G. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells / G. Belliot, S. V. Sosnovtsev, T. Mitra et al. // *Journal of Virology*. — 2003. — Vol. 77. — № 20. — P. 10957–10974.
- 26.** Belliot G. Norovirus Proteinase-Polymerase and Polymerase Are Both Active Forms of RNA-Dependent RNA Polymerase / G. Belliot, S. V. Sosnovtsev, K.-O. Chang et al. // *Journal of Virology*. — 2005. — Vol. 79. — № 4. — P. 2393–2403.
- 27.** Bertolotti-Ciarlet A. Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles / A. Bertolotti-Ciarlet, L. J. White, R. Chen et al. // *Journal of Virology*. — 2002. — Vol. 76. — № 8. — P. 4044–4055.
- 28.** Bidalot M. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017 / M. Bidalot, L. Théry, J. Kaplon et al. // *Eurosurveillance*. — 2017. — Vol. 22. — № 15. — P. 30508.
- 29.** Bierhoff M. Incidence and Clinical Profile of Norovirus Disease in Guatemala, 2008–2013 / M. Bierhoff, W. Arvelo, A. Estevez et al. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2018. — Vol. 67. — № 3. — P. 430–436.
- 30.** BioRender : [сайт]. – Toronto, 2025. – URL: <https://www.biorender.com> (дата обращения: 07.04.2026). – Текст : электронный.
- 31.** BLAST: Basic Local Alignment Search Tool: [сайт]. — Bethesda National Center for Biotechnology Information, 2025. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 07.04.2026). — Текст: электронный.
- 32.** Boonchan M. The dynamics of norovirus genotypes and genetic analysis of a novel recombinant GII.P12-GII.3 among infants and children in Bangkok, Thailand between 2014 and 2016 / M. Boonchan, R. Guntapong, N. Sripirom et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2018. — Vol. 60. — P. 133–139.
- 33.** Bull R. A. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap / R. A. Bull, G. S. Hansman, L. Clancy et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2005. — Vol. 11. — № 7. — P. 1079.

34. Bull R. A. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage / R. A. Bull, J.-S. Eden, W. D. Rawlinson et al. // *PLoS Pathogens*. — 2010. — Vol. 6. — № 3. — P. e1000831.
35. Bull R. A. Norovirus recombination / R. A. Bull, M. M. Tanaka, P. A. White // *Journal of General Virology*. — 2007. — Vol. 88. — № 12. — P. 3347–3359.
36. Bull R. A. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution / R. A. Bull, P. A. White // *Trends in Microbiology*. — 2011. — Vol. 19. — № 5. — P. 233–240.
37. Burke R. M. Burden of Severe Norovirus Disease in Taiwan, 2003–2013 / R. M. Burke, S.-M. Shih, C. Yen et al. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2018. — Vol. 67. — № 9. — P. 1373–1378.
38. Bykov R. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Human Norovirus Sequences Derived from Municipalities within the Sverdlovsk Region of Russia / R. Bykov, T. Itani, P. Starikova et al. // *Viruses*. — 2024. — Vol. 16. — № 7. — P. 1001.
39. Bykov R. Molecular Characterization and Epidemiology of Human Noroviruses in the Sverdlovsk Region, Russian Federation / R. Bykov, T. Itani, D. Pletenchuk et al. // *Viruses*. — 2025. — Vol. 17. — № 9. — P. 1243.
40. Campillay-Véliz C. P. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response / C. P. Campillay-Véliz, J. J. Carvajal, A. M. Avellaneda et al. // *Frontiers in Immunology*. — 2020. — Vol. 11. — P. 961.
41. Cannon J. L. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses / J. L. Cannon, L. Barclay, N. R. Collins et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2017. — Vol. 55. — № 7. — P. 2208–2221.
42. Cao S. Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus / S. Cao, Z. Lou, M. Tan et al. // *Journal of Virology*. — 2007. — Vol. 81. — № 11. — P. 5949–5957.
43. Chang C.-H. The incidence of medically-attended norovirus gastro-enteritis in Japan: modelling using a medical care insurance claims database / C.-H. Chang, M.

- Sakaguchi, J. Weil, T. Verstraeten // PLoS One. — 2018. — Vol. 13. — № 3. — P. e0195164.
- 44.**Chhabra P. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes / P. Chhabra, M. de Graaf, G. I. Parra et al. // Journal of General Virology. — 2019. — Vol. 100. — № 10. — P. 1393–1406.
- 45.**Chiu S.-C. Molecular Epidemiology of GI.3 Norovirus Outbreaks from Acute Gastroenteritis Surveillance System in Taiwan, 2015–2019 / S.-C. Chiu, J.-K. Hsu, S.-C. Hu et al. // BioMed Research International. — 2020. — Vol. 2020. — P. 4707538.
- 46.**Claro I. M. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing / I. M. Claro, M. S. Ramundo, T. M. Coletti et al. // Wellcome Open Research. — 2023. — Vol. 6. — P. 241.
- 47.**Daughenbaugh K. F. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment / K. F. Daughenbaugh // The EMBO Journal. — 2003. — Vol. 22. — № 11. — P. 2852–2859.
- 48.**De Graaf M. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? / M. De Graaf, J. van Beek, H. Vennema et al. // Eurosurveillance. — 2015. — Vol. 20. — № 26.
- 49.**De Rougemont A. Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens / A. De Rougemont, N. Ruvoen-Clouet, B. Simon et al. // Journal of Virology. — 2011. — Vol. 85. — № 9. — P. 4057–4070.
- 50.**Debbink K. Genetic Mapping of a Highly Variable Norovirus GII.4 Blockade Epitope: Potential Role in Escape from Human Herd Immunity / K. Debbink, E. F. Donaldson, L. C. Lindesmith, R. S. Baric // Journal of Virology. — 2012. — Vol. 86. — № 2. — P. 1214–1226.
- 51.**Debbink K. Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity / K. Debbink, L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson et

- al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2013. — Vol. 208. — № 11. — P. 1877–1887.
- 52.** Dedman D. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990–5 / D. Dedman, H. Laurichesse, E. O. Caul, P. G. Wall // *Epidemiology & Infection*. — 1998. — Vol. 121. — № 1. — P. 139–149.
- 53.** Devasia T. Association of host, agent and environment characteristics and the duration of incubation and symptomatic periods of norovirus gastroenteritis / T. Devasia, B. Lopman, J. Leon, A. Handel // *Epidemiology & Infection*. — 2015. — Vol. 143. — № 11. — P. 2308–2314.
- 54.** Diakoudi G. Analysis of GII.P7 and GII.6 noroviruses circulating in Italy during 2011–2016 reveals a replacement of lineages and complex recombination history / G. Diakoudi, G. Lanave, C. Catella et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2019. — Vol. 75. — P. 103991.
- 55.** Dong X. Should we pay attention to recombinant norovirus strain GII.P7/GII.6? / X. Dong, M. Qin, Z. Wang et al. // *Journal of Infection and Public Health*. — 2019. — Vol. 12. — № 3. — P. 403–409.
- 56.** Duffy S. Evolution of host specificity drives reproductive isolation among RNA viruses / S. Duffy, C. L. Burch, P. E. Turner // *Evolution*. — 2007. — Vol. 61. — № 11. — P. 2614–2622.
- 57.** Eden J.-S. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008 / J.-S. Eden, R. A. Bull, E. Tu et al. // *Journal of Clinical Virology*. — 2010. — Vol. 49. — № 4. — P. 265–271.
- 58.** Eden J.-S. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage / J.-S. Eden, M. M. Tanaka, M. F. Boni et al. // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87. — № 11. — P. 6270–6282.
- 59.** Eden J.-S. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012 / J.-S. Eden, J. Hewitt, K. L. Lim et al. // *Virology*. — 2014. — Vol. 450–451. — P. 106–113.
- 60.** Elias I. Fast neighbor joining / I. Elias, J. Lagergren // *Theoretical Computer Science*. — 2009. — Vol. 410. — № 21–23. — P. 1993–2000.

- 61.**Elkins C. A. Single nucleotide polymorphism analysis of the major tripartite multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: functional conservation in disparate animal reservoirs despite exposure to antimicrobial chemotherapy / C. A. Elkins, L. B. Mullis, D. W. Lacher, C. M. Jung // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2010. — Vol. 54. — № 3. — P. 1007–1015.
- 62.**Epifanova N. V. An increase in prevalence of recombinant GII.3[P12] norovirus in sporadic acute diarrhea in children in Nizhny Novgorod, Russia, 2018–2021 / N. V. Epifanova, T. A. Sashina, O. V. Morozova et al. // *Virus Genes*. — 2022. — Vol. 58. — № 5. — P. 467–472.
- 63.**Epifanova N. V. Re-emergence and Spread of Norovirus Genotype GII.17 Variant C in 2021-2023 / N. V. Epifanova, S. V. Oparina, O. V. Morozova et al. // *Research Square*. — 2024.
- 64.**Ettayebi K. Norwalk Virus Nonstructural Protein p48 Forms a Complex with the SNARE Regulator VAP-A and Prevents Cell Surface Expression of Vesicular Stomatitis Virus G Protein / K. Ettayebi, M. E. Hardy // *Journal of Virology*. — 2003. — Vol. 77. — № 21. — P. 11790–11797.
- 65.**Fernandez-Mateos P. Point mutations and deletion responsible for the Bombay H null and the Reunion H weak blood groups / P. Fernandez-Mateos, A. Cailleau, S. Henry et al. // *Vox Sanguinis*. — 1998. — Vol. 75. — № 1. — P. 37–46.
- 66.**Ferrer-Admetlla A. A Natural History of FUT2 Polymorphism in Humans / A. Ferrer-Admetlla, M. Sikora, H. Laayouni et al. // *Molecular Biology and Evolution*. — 2009. — Vol. 26. — № 9. — P. 1993–2003.
- 67.**Ford-Siltz L. A. Genotype-Specific Neutralization of Norovirus Is Mediated by Antibodies Against the Protruding Domain of the Major Capsid Protein / L. A. Ford-Siltz, S. Wales, K. Tohma et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2022. — Vol. 225. — № 7. — P. 1205–1214.
- 68.**Ford-Siltz L. A. Understanding the relationship between norovirus diversity and immunity / L. A. Ford-Siltz, K. Tohma, G. I. Parra // *Gut Microbes*. — 2021. — Vol. 13. — № 1. — P. 1900994.

69. Frange P. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies / P. Frange, F. Touzot, M. Debré et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2012. — Vol. 206. — № 8. — P. 1269–1274.
70. Frost S. D. W. Neutral Theory and Rapidly Evolving Viral Pathogens / S. D. W. Frost, B. R. Magalis, S. L. Kosakovsky Pond // *Molecular Biology and Evolution*. — 2018. — Vol. 35. — № 6. — P. 1348–1354.
71. Fu J. Genotypic diversity and recombination of norovirus GI.6[P11] associated acute gastroenteritis outbreaks in Beijing, China, from 2016 to 2019 / J. Fu, L. Shen, W. Li et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2023. — Vol. 114. — P. 105491.
72. Gallimore C. I. Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a Hospital Outbreak of Gastroenteritis / C. I. Gallimore, D. Cubitt, N. du Plessis, J. J. Gray // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2004. — Vol. 42. — № 5. — P. 2271–2274.
73. Gascuel O. Neighbor-Joining Revealed / O. Gascuel, M. Steel // *Molecular Biology and Evolution*. — 2006. — Vol. 23. — № 11. — P. 1997–2000.
74. Gastañaduy P. A. Burden of norovirus gastroenteritis in the ambulatory setting—United States, 2001–2009 / P. A. Gastañaduy, A. J. Hall, A. T. Curns et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2013. — Vol. 207. — № 7. — P. 1058–1065.
75. Giammanco G. M. Analysis of early strains of the norovirus pandemic variant GII.4 Sydney 2012 identifies mutations in adaptive sites of the capsid protein / G. M. Giammanco, S. De Grazia, V. Terio et al. // *Virology*. — 2014. — Vol. 450. — P. 355–358.
76. Giampaoli O. Can the FUT2 Non-secretor Phenotype Associated With Gut Microbiota Increase the Children Susceptibility for Type 1 Diabetes? A Mini Review / O. Giampaoli, G. Conta, R. Calvani, A. Miccheli // *Frontiers in Nutrition*. — 2020. — Vol. 7. — P. 606171.
77. Glass R. I. Norovirus Gastroenteritis / R. I. Glass, U. D. Parashar, M. K. Estes // *New England Journal of Medicine*. — 2009. — Vol. 361. — № 18. — P. 1776–1785.

- 78.**Gojobori T. Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory / T. Gojobori, E. N. Moriyama, M. Kimura // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1990. — Vol. 87. — № 24. — P. 10015–10018.
- 79.**Hall A. J. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999–2007 / A. J. Hall, A. T. Curns, L. C. McDonald et al. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2012. — Vol. 55. — № 2. — P. 216–223.
- 80.**Hall A. J. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001–2008 / A. J. Hall, V. G. Eisenbart, A. L. Etingüe et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2012. — Vol. 18. — № 10. — P. 1566.
- 81.**Hardy M. E. Norovirus protein structure and function / M. E. Hardy // *FEMS Microbiology Letters*. — 2005. — Vol. 253. — № 1. — P. 1–8.
- 82.**Hasing M. E. Emergence of a New Norovirus GII.4 Variant and Changes in the Historical Biennial Pattern of Norovirus Outbreak Activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013 / M. E. Hasing, B. E. Lee, J. K. Preiksaitis et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2013. — Vol. 51. — № 7. — P. 2204–2211.
- 83.**Hernandez J. M. Evolutionary and Molecular Analysis of Complete Genome Sequences of Norovirus from Brazil: Emerging Recombinant Strain GII.P16/GII.4 / J. M. Hernandez, L. Damascena, E. Costa et al. // *Frontiers in Microbiology*. — 2020. — Vol. 11. — P. 1870.
- 84.**Ho Z. J. M. Emergence of norovirus GI.2 outbreaks in military camps in Singapore / Z. J. M. Ho, G. Vithia, C. G. Ng et al. // *International Journal of Infectious Diseases*. — 2015. — Vol. 31. — P. 23–30.
- 85.**Hoa Tran T. N. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants / T. N. Hoa Tran, E. Trainor, T. Nakagomi et al. // *Journal of Clinical Virology*. — 2013. — Vol. 56. — № 3. — P. 269–277.
- 86.**Hosmillo M. Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation / M. Hosmillo, J. Lu, M. R. McAllaster et al. // *eLife*. — 2019. — Vol. 8. — P. e46681.

- 87.**Hu M. Fucosyltransferase 2: A Genetic Risk Factor for Intestinal Diseases / M. Hu, X. Zhang, J. Li et al. // *Frontiers in Microbiology*. — 2022. — Vol. 13.
- 88.**Huang P. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns / P. Huang, T. Farkas, W. Zhong et al. // *Journal of Virology*. — 2005. — Vol. 79. — № 11. — P. 6714–6722.
- 89.**Hutson A. M. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type / A. M. Hutson, R. L. Atmar, D. Y. Graham, M. K. Estes // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2002. — Vol. 185. — № 9. — P. 1335–1337.
- 90.**International Committee on Taxonomy of Viruses: [сайт]. — URL: <https://ictv.global> (дата обращения: 21.03.2024). — Текст: электронный.
- 91.**Jin M. Characterization of the new GII.17 norovirus variant that emerged recently as the predominant strain in China / M. Jin, Y. Zhou, H. Xie et al. // *Journal of General Virology*. — 2016. — Vol. 97. — № 10. — P. 2620–2632.
- 92.**Kaneko M. Wide variety of point mutations in the H gene of Bombay and para-Bombay individuals that inactivate H enzyme / M. Kaneko, S. Nishihara, N. Shinya et al. // *Blood*. — 1997. — Vol. 90. — № 2. — P. 839–849.
- 93.**Karve S. Burden of acute gastroenteritis, norovirus and rotavirus in a managed care population / S. Karve, G. Krishnarajah, J. S. Korsnes et al. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2014. — Vol. 10. — № 6. — P. 1544–1556.
- 94.**Kelly R. J. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene (FUT2): homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype / R. J. Kelly, S. Rouquier, D. Giorgi et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1995. — Vol. 270. — № 9. — P. 4640–4649.
- 95.**Kendra J. A. Global and regional circulation trends of norovirus genotypes and recombinants, 1995–2019: A comprehensive review of sequences from public databases / J. A. Kendra, K. Tohma, G. I. Parra // *Reviews in Medical Virology*. — 2022. — Vol. 32. — № 5. — P. e2354.

- 96.** Kindberg E. Host Genetic Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII.4) Infections in Denmark / E. Kindberg, B. Akerlind, C. Johnsen et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2007. — Vol. 45. — № 8. — P. 2720–2722.
- 97.** Koda Y. Molecular basis for secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency / Y. Koda, M. Soejima, Y. Liu, H. Kimura // *American Journal of Human Genetics*. — 1996. — Vol. 59. — № 2. — P. 343.
- 98.** Kojima S. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses / S. Kojima, T. Kageyama, S. Fukushi et al. // *Journal of Virological Methods*. — 2002. — Vol. 100. — № 1–2. — P. 107–114.
- 99.** Kolawole A. O. Norovirus Escape from Broadly Neutralizing Antibodies Is Limited to Allosteric-Like Mechanisms / A. O. Kolawole, H. Q. Smith, S. A. Svoboda et al. // *mSphere*. — 2017. — Vol. 2. — № 5. — P. e00334-17.
- 100.** Kotloff K. L. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study / K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder et al. // *The Lancet*. — 2013. — Vol. 382. — № 9888. — P. 209–222.
- 101.** Kowalzik F. Norovirus gastroenteritis among hospitalized patients, Germany, 2007–2012 / F. Kowalzik, H. Binder, D. Zöller et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2018. — Vol. 24. — № 11. — P. 2021.
- 102.** Kroneman A. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping / A. Kroneman, E. Vega, H. Vennema et al. // *Archives of Virology*. — 2013. — Vol. 158. — № 10. — P. 2059–2068.
- 103.** Lateef Z. Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes / Z. Lateef, G. Gimenez, E. S. Baker, V. K. Ward // *BMC Genomics*. — 2017. — Vol. 18. — № 1. — P. 39.
- 104.** Leen E. N. A conserved interaction between a C-terminal motif in norovirus VPg and the HEAT-1 domain of eIF4G is essential for translation initiation / E. N. Leen, F. Sorgeloos, S. Correia et al. // *PLoS Pathogens*. — 2016. — Vol. 12. — № 1. — P. e1005379.

- 105.** Li T.-F. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities / T.-F. Li, M. Hosmillo, H. Schwanke et al. // *Journal of Virology*. — 2018. — Vol. 92. — № 5. — P. e01606-17.
- 106.** Lim K. L. Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004-2011 / K. L. Lim, J.-S. Eden, L. L. E. Oon, P. A. White // *Journal of Medical Virology*. — 2013. — Vol. 85. — № 10. — P. 1842–1851.
- 107.** Lin Y. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels / Y. Lin, L. Fengling, W. Lianzhu et al. // *Journal of Microbiology*. — 2014. — Vol. 52. — № 11. — P. 970–975.
- 108.** Lindesmith L. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection / L. Lindesmith, C. Moe, S. Marionneau et al. // *Nature Medicine*. — 2003. — Vol. 9. — № 5. — P. 548–553.
- 109.** Lindesmith L. C. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations / L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, A. D. LoBue et al. // *PLoS Medicine*. — 2008. — Vol. 5. — № 2. — P. e31.
- 110.** Lindesmith L. C. Immunogenetic Mechanisms Driving Norovirus GII.4 Antigenic Variation / L. C. Lindesmith, M. Beltramello, E. F. Donaldson et al. // *PLoS Pathogens*. — 2012. — Vol. 8. — № 5. — P. e1002705.
- 111.** Lindesmith L. C. Emergence of a Norovirus GII.4 Strain Correlates with Changes in Evolving Blockade Epitopes / L. C. Lindesmith, V. Costantini, J. Swanstrom et al. // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87. — № 5. — P. 2803–2813.
- 112.** Lindesmith L. C. Norovirus GII.4 Strain Antigenic Variation / L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, R. S. Baric // *Journal of Virology*. — 2011. — Vol. 85. — № 1. — P. 231–242.
- 113.** Lopman B. A. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings / B. A. Lopman, M. H. Reacher, I. B. Vipond et al. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2004. — Vol. 39. — № 3. — P. 318–324.

- 114.** Lopman B. A. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control / B. A. Lopman, D. Steele, C. D. Kirkwood, U. D. Parashar // *PLoS Medicine*. — 2016. — Vol. 13. — № 4. — P. e1001999.
- 115.** Ludwig-Begall L. F. Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab – a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses / L. F. Ludwig-Begall, A. Mauroy, E. Thiry // *Journal of General Virology*. — 2018. — Vol. 99. — № 8. — P. 970–988.
- 116.** Mahar J. E. The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution / J. E. Mahar, K. Bok, K. Y. Green, C. D. Kirkwood // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87. — № 7. — P. 3687–3698.
- 117.** Mahar J. E. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: Prevalence of recombinant strains / J. E. Mahar, C. D. Kirkwood // *Journal of Medical Virology*. — 2011. — Vol. 83. — № 12. — P. 2213–2219.
- 118.** Marionneau S. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals / S. Marionneau, N. Ruvoën, B. Le Moullac-Vaidye et al. // *Gastroenterology*. — 2002. — Vol. 122. — № 7. — P. 1967–1977.
- 119.** May J. Enzyme kinetics of the human norovirus protease control virus polyprotein processing order / J. May, B. Korba, A. Medvedev, P. Viswanathan // *Virology*. — 2013. — Vol. 444. — № 1–2. — P. 218–224.
- 120.** Medvedev A. Regulation of human norovirus VPg nucleotidylation by ProPol and nucleoside triphosphate binding by its amino terminal sequence in vitro / A. Medvedev, P. Viswanathan, J. May, B. Korba // *Virology*. — 2017. — Vol. 503. — P. 37–45.
- 121.** Mladenova Z. Aetiology of acute paediatric gastroenteritis in Bulgaria during summer months: prevalence of viral infections / Z. Mladenova, A. Steyer, A. F. Steyer et al. // *Journal of Medical Microbiology*. — 2015. — Vol. 64. — № 3. — P. 272–282.
- 122.** Navarro-Lleó N. Recombinant Noroviruses Circulating in Spain from 2016 to 2020 and Proposal of Two Novel Genotypes within Genogroup I / N. Navarro-Lleó,

- C. Santiso-Bellón, S. Vila-Vicent et al. // *Microbiology Spectrum*. — 2022. — Vol. 10. — № 4. — P. e02505-21.
- 123.** Niendorf S. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016 / S. Niendorf, S. Jacobsen, M. Faber et al. // *Eurosurveillance*. — 2017. — Vol. 22. — № 4. — P. 30447.
- 124.** Nishimaki T. An Extension of the Kimura Two-Parameter Model to the Natural Evolutionary Process / T. Nishimaki, K. Sato // *Journal of Molecular Evolution*. — 2019. — Vol. 87. — № 1. — P. 60–67.
- 125.** Nordgren J. Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection / J. Nordgren, S. Sharma, A. Kambhampati et al. // *PLoS Pathogens*. — 2016. — Vol. 12. — № 4. — P. e1005385.
- 126.** Pabbaraju K. Emergence of a novel recombinant norovirus GII.P16-GII.12 strain causing gastroenteritis, Alberta, Canada / K. Pabbaraju, A. A. Wong, G. A. Tipples, X.-L. Pang // *Emerging Infectious Diseases*. — 2019. — Vol. 25. — № 8. — P. 1556.
- 127.** Papamichail D. Live phylogeny with polytomies: Finding the most compact parsimonious trees / D. Papamichail, A. Huang, E. Kennedy et al. // *Computational Biology and Chemistry*. — 2017. — Vol. 69. — P. 171–177.
- 128.** Parra G. I. Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity / G. I. Parra, R. B. Squires, C. K. Karangwa et al. // *PLoS Pathogens*. — 2017. — Vol. 13. — № 1. — P. e1006136.
- 129.** Parra G. I. Emergence of norovirus strains: A tale of two genes / G. I. Parra // *Virus Evolution*. — 2019. — Vol. 5. — № 2. — P. vez048.
- 130.** Payne D. C. Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children / D. C. Payne, J. Vinjé, P. G. Szilagyi et al. // *New England Journal of Medicine*. — 2013. — Vol. 368. — № 12. — P. 1121–1130.
- 131.** Peña-Gil N. The Role of Host Glycobiology and Gut Microbiota in Rotavirus and Norovirus Infection, an Update / N. Peña-Gil, C. Santiso-Bellón, R. Gozalbo-Rovira et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — Vol. 22. — № 24. — P. 13473.

- 132.** Pfister T. Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase / T. Pfister, E. Wimmer // *Journal of Virology*. — 2001. — Vol. 75. — № 4. — P. 1611–1619.
- 133.** Phan T. G. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan / T. G. Phan, T. Kuroiwa, K. Kaneshi et al. // *Journal of Medical Virology*. — 2006. — Vol. 78. — № 7. — P. 971–978.
- 134.** Pires S. M. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food / S. M. Pires, C. L. Fischer-Walker, C. F. Lanata et al. // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10. — № 12. — P. e0142927.
- 135.** Prasad B. V. V. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid / B. V. V. Prasad, M. E. Hardy, T. Dokland et al. // *Science*. — 1999. — Vol. 286. — № 5438. — P. 287–290.
- 136.** Rattanapan Y. Genotyping of the rare Para-Bombay blood group in southern Thailand / Y. Rattanapan, N. Charong, S. Narkpetch, T. Chareonsirisuthigul // *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. — 2023. — Vol. 45. — № 4. — P. 449–455.
- 137.** Reuter G. Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary / G. Reuter, H. Vennema, M. Koopmans, G. Szucs // *Journal of Clinical Virology*. — 2006. — Vol. 35. — № 1. — P. 84–88.
- 138.** Rockx B. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study / B. Rockx, M. de Wit, H. Vennema et al. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2002. — Vol. 35. — № 3. — P. 246–253.
- 139.** Rose R. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE / R. Rose, O. Golosova, D. Sukhomlinov et al. // *Bioinformatics*. — 2019. — Vol. 35. — № 11. — P. 1963–1965.
- 140.** Roth A. N. Norovirus mechanisms of immune antagonism / A. N. Roth, S. M. Karst // *Current Opinion in Virology*. — 2016. — Vol. 16. — P. 24–30.

141. Ruis C. Preadaptation of pandemic GII.4 noroviruses in unsampled virus reservoirs years before emergence / C. Ruis, L. C. Lindesmith, M. L. Mallory et al. // *Virus Evolution*. — 2020. — Vol. 6. — № 2. — P. veaa067.
142. Ruvoën-Clouet N. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution / N. Ruvoën-Clouet, G. Belliot, J. Le Pendu // *Reviews in Medical Virology*. — 2013. — Vol. 23. — № 6. — P. 355–366.
143. Sapega E. Yu. Epidemiological and molecular genetic analysis of norovirus infection outbreaks in the Amur Oblast in 2024 / E. Yu. Sapega, L. V. Butakova, O. E. Trotsenko et al. // *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. — 2024. — № 46. — P. 40–44.
144. Shanker S. Structural Analysis of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in a Norovirus GII.4 Epidemic Variant: Implications for Epochal Evolution / S. Shanker, J.-M. Choi, B. Sankaran et al. // *Journal of Virology*. — 2011. — Vol. 85. — № 17. — P. 8635–8645.
145. Sharp T. M. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal / T. M. Sharp, S. Guix, K. Katayama et al. // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5. — № 10. — P. e13130.
146. Shirato H. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding / H. Shirato, S. Ogawa, H. Ito et al. // *Journal of Virology*. — 2008. — Vol. 82. — № 21. — P. 10756–10767.
147. Siebenga J. J. Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006 / J. J. Siebenga, H. Vennema, B. Renckens et al. // *Journal of Virology*. — 2007. — Vol. 81. — № 18. — P. 9932–9941.
148. Siebenga J. J. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007 / J. J. Siebenga, H. Vennema, D.-P. Zheng et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2009. — Vol. 200. — № 5. — P. 802–812.

- 149.** Siebenga J. J. Phylodynamic Reconstruction Reveals Norovirus GII.4 Epidemic Expansions and their Molecular Determinants / J. J. Siebenga, P. Lemey, S. L. Kosakovsky Pond et al. // *PLoS Pathogens*. — 2010. — Vol. 6. — № 5. — P. e1000884.
- 150.** SWISS-MODEL: [сайт]. — Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics, 2025. — URL: <https://swissmodel.expasy.org> (дата обращения: 07.04.2026). — Текст: электронный.
- 151.** Tan M. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection / M. Tan, M. Jin, H. Xie et al. // *Journal of Medical Virology*. — 2008. — Vol. 80. — № 7. — P. 1296–1301.
- 152.** Teunis P. F. M. Norwalk virus: How infectious is it? / P. F. M. Teunis, C. L. Moe, P. Liu et al. // *Journal of Medical Virology*. — 2008. — Vol. 80. — № 8. — P. 1468–1476.
- 153.** Thorne L. G. Norovirus gene expression and replication / L. G. Thorne, I. G. Goodfellow // *Journal of General Virology*. — 2014. — Vol. 95. — № 2. — P. 278–291.
- 154.** Thorven M. A homozygous nonsense mutation (428G→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections / M. Thorven, A. Grahn, K.-O. Hedlund et al. // *Journal of Virology*. — 2005. — Vol. 79. — № 24. — P. 15351–15355.
- 155.** Tohma K. Population Genomics of GII.4 Noroviruses Reveal Complex Diversification and New Antigenic Sites Involved in the Emergence of Pandemic Strains / K. Tohma, C. J. Lepore, Y. Gao et al. // *mBio*. — 2019. — Vol. 10. — № 5. — P. e02202-19.
- 156.** Tohma K. Genome-wide analyses of human noroviruses provide insights on evolutionary dynamics and evidence of coexisting viral populations evolving under recombination constraints / K. Tohma, C. J. Lepore, M. Martinez et al. // *PLoS Pathogens*. — 2021. — Vol. 17. — № 7. — P. e1009744.
- 157.** Trang N. V. Association between Norovirus and Rotavirus Infection and Histo-Blood Group Antigen Types in Vietnamese Children / N. V. Trang, H. T. Vu, N. T.

- Le et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2014. — Vol. 52. — № 5. — P. 1366–1374.
- 158.** Untergasser A. Primer3—new capabilities and interfaces / A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar et al. // *Nucleic Acids Research*. — 2012. — Vol. 40. — № 15. — P. e115.
- 159.** Vakulenko Y. A. Patterns and temporal dynamics of natural recombination in noroviruses / Y. A. Vakulenko, A. V. Orlov, A. N. Lukashev // *Viruses*. — 2023. — Vol. 15. — № 2. — P. 372.
- 160.** Verstraeten T. Estimating the Burden of Medically Attended Norovirus Gastroenteritis: Modeling Linked Primary Care and Hospitalization Datasets / T. Verstraeten, T. Cattaert, J. Harris et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2017. — Vol. 216. — № 8. — P. 957–965.
- 161.** Vinjé J. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses / J. Vinjé, R. A. Hamidjaja, M. D. Sobsey // *Journal of Virological Methods*. — 2004. — Vol. 116. — № 2. — P. 109–117.
- 162.** Viskovska M. A. GII.4 Norovirus Protease Shows pH-Sensitive Proteolysis with a Unique Arg-His Pairing in the Catalytic Site / M. A. Viskovska, B. Zhao, S. Shanker et al. // *Journal of Virology*. — 2019. — Vol. 93. — № 6. — P. e01479-18.
- 163.** Vongpunsawad S. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain / S. Vongpunsawad, B. V. Venkataram Prasad, M. K. Estes // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87. — № 9. — P. 4818–4825.
- 164.** Wacklin P. Secretor Genotype (FUT2 gene) Is Strongly Associated with the Composition of Bifidobacteria in the Human Intestine / P. Wacklin, H. Mäkivuokko, N. Alakulppi et al. // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6. — № 5. — P. e20113.
- 165.** Wallace I. M. Evaluation of iterative alignment algorithms for multiple alignment / I. M. Wallace, O. Orta, D. G. Higgins // *Bioinformatics*. — 2005. — Vol. 21. — № 8. — P. 1408–1414.

- 166.** White P. A. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia / P. A. White, G. S. Hansman, A. Li et al. // *Journal of Medical Virology*. — 2002. — Vol. 68. — № 1. — P. 113–118.
- 167.** White P. A. Evolution of norovirus / P. A. White // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2014. — Vol. 20. — № 8. — P. 741–745.
- 168.** Yu J. Incidence of norovirus-associated diarrhea, Shanghai, China, 2012–2013 / J. Yu, C. Ye, S. Lai et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2017. — Vol. 23. — № 2. — P. 312.
- 169.** Yu Y. Genetic Diversity and Distribution of Human Norovirus in China (1999–2011) / Y. Yu, S. Yan, B. Li et al. // *BioMed Research International*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1–13.
- 170.** Zheng D.-P. Norovirus classification and proposed strain nomenclature / D.-P. Zheng, T. Ando, R. L. Fankhauser et al. // *Virology*. — 2006. — Vol. 346. — № 2. — P. 312–323.
- 171.** Zhirakovskaia E. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009–2012 / E. Zhirakovskaia, A. Tikunov, A. Tymmentsev et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2019. — Vol. 67. — P. 167–182.
- 172.** Zhirakovskaia E. V. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003–2012 / E. V. Zhirakovskaia, A. Y. Tikunov, S. A. Bodnev et al. // *Journal of Medical Virology*. — 2015. — Vol. 87. — № 5. — P. 740–753.
- 173.** Zhirakovskaia E. V. Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia / E. V. Zhirakovskaia, A. Y. Tikunov, S. N. Sokolov et al. // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. — 2020. — Vol. 24. — № 1. — P. 69–79.

9. ПРИЛОЖЕНИЕ

9.1 Приложение 1

Таблица П1. Референсные последовательности норовирусов, использованные для филогенетического анализа фрагмента ORF1/ORF2

Генотип	Референс	Accession Number	Источник	Год
GII.4	Norovirus GII strain Hu/BRA/2016/GII.P16-GII.4/RJ LVCA25726	KY451986.1	Бразилия	2016
GII.4	Norovirus KMU/GII.4/322	OR399125.1	Россия	–
GII.4	Norovirus CMH-ST121-19/TH/GII.4/2019	OP349135.1	Таиланд	2019
GII.4	Norovirus GII isolate LVCA29740/BRA/2018	MZ285706.1	Бразилия	2018
GII.4	Norovirus GII Hu/IN/2018/GII.4 SydneyP16/NICED-RV-567	LC769708.1	Индия	2018
GII.4	Norovirus GII isolate/Netherlands/GII.4/2018	OP205561.1	Нидерланды	2018
GII.4	Norovirus GII isolate/Portugal/GII.4/Q1/2018	OR046653.1	Португалия	2018

GII.4	Norovirus GII.4 Hu/GII.4P31/211/Tokyo /2021/Japan	LC726027.1	Япония	2021
GII.4	Norovirus GII isolate Hu/GII.4 SydneyP16/Portage0042 /2023/USA	PQ195932.1	США	2023
GII.4	Norovirus/Revdia/GII.4/ 582	OR447703.1	Россия, Ревда	–
GII.4	Norovirus KMU/GII.4/323	OR399126.1	Россия	–
GII.7	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/GII.TP7/283	OK284578.1	Россия	2019
GII.7	Norovirus GII isolate Hu/ES/GII.TP7/4109	MT501859.1	Испания	2020
GII.7	Norovirus GII isolate NSW19N/AU/217	PP733424.1	Австралия	2019
GII.7	Norovirus GII isolate/SA/GII.TP7/719	OP289789.1	Южная Африка	2019
GII.7	Norovirus GII isolate/SA/GII.TP7/729	OP289790.1	Южная Африка	2019
GII.7	Norovirus GII isolate/SA/GII.TP7/714	OP289787.1	Южная Африка	2019
GII.7	Norovirus GII isolate/SA/GII.TP7/34	OP289786.1	Южная Африка	2019

GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/150 04	MW582168.1	Индия	2004
GII.7	Norovirus GII isolate/Arg/GII.TP7/150 69	MN535196.1	Аргентина	2016
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/151 90	MW582169.1	Индия	2004
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/141 18	MW582161.1	Индия	2003
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/996 3	MW582156.1	Индия	2003
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/969 0	MW582152.1	Индия	2003
GII.7	Norovirus GII isolate/Arg/GII.TP7/134 29	MW649145.1	Аргентина	2014
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/818 5	MW582143.1	Индия	2003
GII.7	Norovirus GII isolate/Ind/GII.TP7/203 54	MW582191.1	Индия	2004

GII.7	Norovirus GII isolate Hu/ES/GII.TP7/3544	MT908854.1	Испания	2016
GII.7	Norovirus GII isolate/JP/18081/GII.TP 7	OQ881051.1	Япония	2018
GII.7	Norovirus Hu/GII.TP7/GBRAZIL/ 16014	KX353830.1	Бразилия	2016
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.P17- GII.17/RUS/Novosibirsk/ NS16-A546/2016	KY210954.1	Россия, Новосибирск	2016
GII.17	Norovirus GII isolate Hu/GII.17/Pingtung/7- 8/2017/TW	MF996738.1	Тайвань	2017
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.P17- GII.17/RUS/Novosibirsk/ NS16-A603/2016	KY210960.1	Россия, Новосибирск	2016
GII.17	Norovirus GII.17 strain NoV/Env/BRA/161075 0/2016/GII.17	MF683034.1	Бразилия	2016
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.17/SHZ04/2016/ CHN	MH191283.1	Китай	2016
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.17/SHZ02/2016/ CHN	MH191284.1	Китай	2016

GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.17/LX09/2015/ CHN	MH191296.1	Китай	2015
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.17/LX08/2015/ CHN	MH191295.1	Китай	2015
GII.17	Norovirus GII isolate Hu/GII.17/Pingtung/13- 3/2017/TW	MF996737.1	Тайвань	2017
GII.17	Norovirus GII.17 isolate Hu/GII.17/Z5474- LVCA/2016/BRA	KU785372.1	Бразилия	2016
GII.17	Norovirus GII.17 Hu/GII.17P17/1195/Tok yo/2022/Japan	LC726067.1	Япония	2022
GII.17	Norovirus GII.17 Hu/GII.17P17/1390/Tok yo/2021/Japan	LC726066.1	Япония	2021
GII.17	Norovirus GII.17 Hu/GII.17P17/613/Toky o/2020/Japan	LC644984.1	Япония	2020
GII.17	Norovirus GII isolate 1249700/Dhaka Hospital/icddrb/Banglad esh	PQ455564.1	Бангладеш	–
GII.17	Norovirus GII isolate 2224800/Dhaka	PQ455586.1	Бангладеш	–

	Hospital/icddrb/Bangladesh			
GII.17	Norovirus Hu/GII/CN/2015/GII.17 /FX140423-5	KF20507.1	Китай	2015
GII.17	Norovirus Hu/GII.17/A113/Limbe/ 2009/Cameron	JF802505.1	Камерун	2009
GII.6	Norovirus GII isolate 720E 14/SA/GII.6P7/2020	OP246268.1	Южная Африка	2020
GII.6	Norovirus GII strain Norovirus/Hu/GII.P7 GII.6/NSW1339/2016/A U	MG585753.1	Австралия	2016
GII.6	Norovirus GII.6/Hu/RU/Yekaterin burg/2023 1431	OR751621.1	Россия, Екатеринбург	2023
GII.8	Norovirus GII isolate 1770/Ind/GII.8P8/2002	MW648473.1	Индия	2002
GII.8	Norovirus GII isolate GII/Hu/TH/2023/GII.8/ Nov35	PP645199.1	Таиланд	2023
GII.8	Norovirus GII isolate GII/Hu/TH/2023/GII.8P 8/B10069	OR546400.1	Таиланд	2023

GII.8	Norovirus GII isolate GII/Hu/TH/2023/GII.8P 8/B9202	OR546396.1	Таиланд	2023
GII.8	Norovirus GII.8/Hu/RU/Yekaterin burg/2023 1429	OR751620.1	Россия, Екатеринбург	2023
GII.8	Norovirus Hu/GII.8/A155/Limbe/2 009/Cameroon	JF802498.1	Камерун	2009
GII.8	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2019/GII.8P 8/Nizhny Novgorod14	OK284574.1	Россия, Нижний Новгород	2019
GII.8	Norovirus Hu/GII.8/GII.8/LNOV PA16001/BRAZIL/201 6	KX353831.1	Бразилия	2016
GII.8	Norovirus GII isolate SZ18157/CHN/GII.8P8/ 2018	MK720581.1	Китай	2018
GII.8	Norovirus GII isolate/SK/GII.8P8/2018	MZ021918.1	Южная Корея	2018
GII.8	Norovirus GII isolate AS01/SK/GII.8P8/2019	MZ021665.1	Южная Корея	2019
GII.3	Norovirus GII isolate/CHN/JP/ES/Niz Nov	(обобщённая)	Китай, Япония, Испания, Россия	—

GI.3	Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FS 421-2014	LC378985.1	Япония	2015
GI.3	Norovirus GI isolate ND- 0966/Ind/GI.3/P3/2015	MW368604.1	Индия	2015
GI.6	Norovirus GI isolate YT406- 7/CHN/2015/GI.6	MN204090.1	Китай	2015
GI.6	Norovirus GI isolate YT404- 4/CHN/2015/GI.6	MN204094.1	Китай	2015
GI.6	Norovirus GI isolate YT480- 7/CHN/2015/GI.6	MN204103.1	Китай	2015
GI.6	Norovirus GI isolate YT010- 10/CHN/2016/GI.6	MN204153.1	Китай	2016
GI.6	Norovirus GI isolate Hu/US/2018/GI.BP1/C5 0036	MT357996.1	США	2018
GI.2	Norovirus GI isolate 220R 4/SA/GI.2/2020	OP746929.1	Южная Африка	2020
GI.7	Norovirus GI isolate SZ1855/CHN/GI.7/2018	MK692751.1	Китай	2018

GI.7	Norovirus GI.7 Hu/GI.P7/1177F/Tokyo/ 2020/Japan	LC646334.1	Япония	2020
GI.5	Norovirus GI isolate SALTO/Uruguay/GI.5/2 018	BK892751.1	Уругвай	2018
GI.5	Norovirus GI isolate MTY0115/Mexico/GI.5/ P4/2018	PQ369661.1	Мексика	2018
GI.5	Norovirus GI isolate NSW4716/Nov/2018/GI .P4/2020	PP733369.1	Австралия	2020
GI.5	Norovirus GI isolate NSW360/Jan/2018/GI.P 4/2020	PP733365.1	Австралия	2020
GI.5	Norovirus GI isolate LVCA33628/BRA/2022	OR780778.1	Бразилия	2022
GI.5	Norovirus GI isolate PT05.02.22/BRA/GI.5/2 022	PV022786.1	Бразилия	2022
GI.5	Norovirus GI.5 Hu/GI.P5/433/Tokyo/20 21/Japan	LC726070.1	Япония	2021
GI.5	Norovirus GI isolate NoV/Chenghua 14- May-2018/CN	MK121731.1	Китай	2018

GI.5	Norovirus GI isolate FX220602- 9/CHN/GI.P4/2022	OP862379.1	Китай	2022
GI.5	Norovirus GI isolate ZJ- 562- 21/CHN/GI.P4/2021	OR597879.1	Китай	2021
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod3180	OR478012.1	Нижний Новгород, Россия	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod3191	OR478013.1	Нижний Новгород, Россия	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2023/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod372	OR478028.1	Нижний Новгород, Россия	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2023/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod373	OR478029.1	Нижний Новгород, Россия	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod139	PQ097892.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod142	PQ097893.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod144	PQ097894.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.4S ydney[P16]/Nizhny_No vgorod190	PQ097895.1	Нижний Новгород, Россия	2024

GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2022/GII.4Sydney[P16]/2KHV	OR775307.1	Хабаровск, Россия	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2023/GII.4[P16]/123KHV	PQ764875.1	Хабаровск, Россия	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2023/GII.4[P16]/125KHV	PQ764876.1	Хабаровск, Россия	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2024/GII4[P16]/2AMUR	PX532253.1	Хабаровск, Россия	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2024/GII4[P16]/180KHV	PX532254.1	Хабаровск, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7[P7]/Nizhny_Novgorod113	PQ100944.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7[P7]/Nizhny_Novgorod132	PQ100945.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7[P7]/Nizhny Novgorod33	PQ100946.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7[P7]/Nizhny Novgorod121	PQ100947.1	Нижний Новгород, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2023/GII.7[P7]/229KHV	PQ764870.1	Хабаровск, Россия	2023
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2023/GII.7[P7]/323AMU	PQ764871.1	Хабаровск, Россия	2023

GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2024/GII7[P7]/10AMUR	PX532255.1	Хабаровск, Россия	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2024/GII7[P7]/11AMUR	PX532256.1	Хабаровск, Россия	2024
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.17 [P17]/Nizhny_Novgorod2613	OR475172.2	Нижний Новгород, Россия	2022
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.17 [P17]/Nizhny_Novgorod2788	OR475174.2	Нижний Новгород, Россия	2022
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2023/GII.17 [P17]/Nizhny_Novgorod302	OR475189.2	Нижний Новгород, Россия	2023
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2023/GII.17 [P17]/Nizhny_Novgorod442	OR475191.2	Нижний Новгород, Россия	2023
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2023/GII.17 [P17]/Nizhny_Novgorod487	OR475192.2	Нижний Новгород, Россия	2023
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2022/GII.17[P17]/381KHV	OR775308.1	Хабаровск, Россия	2022
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate Hu/RUS/2022/GII.17[P17]/434KHV	OR775309.1	Хабаровск, Россия	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4Sydney[P16]/Nizhny_Novgorod3180	OR478012.1	Нижний Новгород, Россия	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4Sydney[P16]/Nizhny_Novgorod3191	OR478013.1	Нижний Новгород, Россия	2022

GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP120605 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458550.1	Россия, Москва	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP121771 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458544.1	Россия, Москва	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP091350 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458543.1	Россия, Москва	2022
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP070261 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX464553.1	Россия, Москва	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP091831 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458513.1	Россия, Москва	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP355047 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458512.1	Россия, Москва	2024
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP100542_B	PX458556.1	Россия, Москва	2022

	nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds			
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP100542_A nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458555.1	Россия, Москва	2022
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP010562 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458475.1	Россия, Москва	2023
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP049916 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458542.1	Россия, Москва	2024
GII.17[P17]	Norovirus GII isolate CSP315541 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458515.1	Россия, Москва	2024
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate CSP120605 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) gene, complete cds	PX458550.1	Россия, Москва	2022

9.2 Приложение 2

Таблица П2. Референсные последовательности полноразмерных геномов норовирусов генотипов GII.4[P16] и GII.7[P7]

Генотип	Референс	Accession Number	Источник	Год
GII.4[P16]	Norovirus GII.4 Sydney 2012 GII/Hu/JP/2023/GII.4S ydneyP16/TKY221301	LC790061.1	Япония	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII/GII/Hu/JP/2023/GII .4GII.P16/EF23-1	LC770250.1	Япония	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII.4 Sydney 2012 GII/Hu/JP/2023/GII.4S ydneyP16/TKY221975	LC790068.1	Япония	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/GII.4 SydneyP16/Portage004 0/2023/USA	PQ195931.1	США	2023
GII.4[P16]	Norovirus GII Hu/IN/2019/GII.4 SydneyP16/NICED- RV-1218	LC769714.1	Индия	2019
GII.4[P16]	Norovirus GII Hu/IN/2019/GII.4 SydneyP16/NICED- BCH-11170	LC769691.1	Индия	2019

GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/GII.4 SydneyP16/Minnesota0 047/2020/USA	PQ214835.1	США	2020
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4 Sydney P16 /Nizhny Novgorod789	OP901694.1	Россия, Нижний Новгород	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2022/GII.4 Sydney P16 /Nizhny Novgorod567	OP712198.1	Россия, Нижний Новгород	2022
GII.4[P16]	Norovirus GII Hu/IN/2018/GII.4 SydneyP16/NICED- RV-567	LC769708.1	Индия	2018
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/US/2016/GII.P16- GII.4 Sydney/Alameda0791	MK756038.1	США	2016
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/UK/2016/GII.P16 GII.4 Sydney2012/NOR-2565	KY887601.1	Великобритания	2016
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/UK/2015/GII.P16 GII.4 Sydney2012/NOR-2518	KY887604.1	Великобритания	2015

GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Hu/US/2016/GII.P16- GII.4 Sydney/CS0651	MK762568.1	США	2016
GII.4[P16]	Norovirus GII strain Hu/GII.P16- GII.4/RUS/Novosibirsk/ NS17-A869/2017	MG892929.3	Россия, Новосибирск	2017
GII.4[P16]	Norovirus GII isolate Arg14249	MW305632.1	Аргентина	—
GII.4[P16]	Norovirus GII strain Hu/USA/2016/GII.P16- GII.4 Sydney/CS4243	KY947549.1	США	2016
GII.4[P16]	Norovirus Hu/GII/JP/2016/GII.P1 6 GII.4 Sydney2012/Kawasaki1 94	LC175468.1	Япония	2016
GII.4[P16]	Norovirus GII strain Hu/USA/2015/GII.P16- GII.4 Sydney/Pasadena347	KY947550.1	США	2015
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7P 7/Nizhny Novgorod176	PQ100948.1	Россия, Нижний Новгород	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7P 7/Nizhny Novgorod121	PQ100947.1	Россия, Нижний Новгород	2024

GII.7[P7]	Norovirus GII isolate GII/Hu/RU/2024/GII.7P 7/Nizhny Novgorod33	PQ100946.1	Россия, Нижний Новгород	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII.7 Hu/GII.7P7/TKY110/20 24/JPN	LC877026.1	Япония	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate IC 97 GII7P7	PQ507186.1	–	–
GII.7[P7]	Norovirus GII.7 Hu/GII.7P7/TKY2874/2 024/JPN	LC877024.1	Япония	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII.7 Hu/GII.7P7/TKY1929/2 024/JPN	LC877021.1	Япония	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII.7 Hu/GII.7P7/TKY2799/2 024/JPN	LC877023.1	Япония	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate IC 285	PQ594187.1	–	–
GII.7[P7]	Norovirus GII.7 Hu/GII.7P7/TKY994/20 24/JPN	LC877033.1	Япония	2024
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate 99HBO GII.7 P7	MW305550.1	–	–
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/US/2018/GII.7P7/C A-RGDS-1096	MT731332.1	США	2018

GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/BT/2015/GII.P7- GII.7/ETR-NV-127	MK762722.1	Бутан	2015
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Arg4416 GII.7 P7	MW305606.1	Аргентина	–
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Arg4237 GII.7 P7	MW305602.1	Аргентина	–
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate P2D3 GII.7 P7	MW284778.1	–	–
GII.7[P7]	Norovirus GII strain Norovirus/GII/Hu/NL/2 013/GII.P7- GII.7/Rotterdam/E1300 27	MF140647.1	Нидерланды	2013
GII.7[P7]	Norovirus GII isolate Hu/US/2011/GII.P7/CA -RGDS-1132	MZ292759.1	США	2011
GII.7[P7]	Norovirus GII genomic RNA polyprotein strain: Hu/GII/JP/2012/GII.P7- GII.7/EH	LC122887.1	Япония	2012
GII.7[P7]	Norovirus GII genomic RNA polyprotein strain: Hu/GII/JP/2013/GII.P7- GII.7/OS	LC122889.1	Япония	2013

9.3 Приложение 3

Таблица ПЗ. Нуклеотидные последовательности норовирусного генома, депонированные в GenBank по результатам исследования образцов клинического материала из Свердловской области (2022–2024 гг.)

№ п/п	Accession Number	Геногруппа	Год
1	ON681575.1	GI	2022
2	ON681576.1	GI	2022
3	ON681577.1	GI	2022
4	ON681578.1	GI	2022
5	ON681579.1	GI	2022
6	ON681580.1	GI	2022
7	ON681581.1	GI	2022
8	ON681582.1	GI	2022
9	ON681583.1	GI	2022
10	ON681584.1	GI	2022
11	ON681585.1	GI	2022
12	ON681586.1	GI	2022
13	OP862363.1	GI	2022
14	OP862364.1	GI	2022
15	OP862365.1	GI	2022
16	OP862366.1	GI	2022
17	OP862367.1	GI	2022
18	OP862368.1	GI	2022
19	OP862428.1	GI	2022
20	OP862429.1	GI	2022
21	OP862430.1	GI	2022
22	OP862431.1	GI	2022
23	OP862432.1	GI	2022
24	OP862435.1	GII	2022
25	OP862436.1	GII	2022
26	OP862437.1	GII	2022
27	OP862438.1	GII	2022
28	OP862439.1	GII	2022

29	OP862440.1	GII	2022
30	OR399123.1	GII	2023
31	OR399124.1	GII	2023
32	OR399125.1	GII	2023
33	OR399126.1	GII	2023
34	OR399127.1	GII	2023
35	OR399128.1	GII	2023
36	OR399129.1	GII	2023
37	OR399130.1	GII	2023
38	OR399131.1	GII	2023
39	OR399132.1	GII	2023
40	OR399133.1	GII	2023
41	OR399134.1	GII	2023
42	OR399135.1	GII	2023
43	OR399136.1	GII	2023
44	OR399137.1	GII	2023
45	OR399138.1	GII	2023
46	OR399139.1	GII	2023
47	OR399140.1	GII	2023
48	OR399141.1	GII	2023
49	OR399142.1	GII	2023
50	OR399143.1	GII	2023
51	OR399144.1	GII	2023
52	OR399145.1	GII	2023
53	OR399146.1	GII	2023
54	OR399514.1	GI	2023
55	OR426510.1	GII	2023
56	OR426511.1	GII	2023
57	OR426512.1	GII	2023
58	OR426513.1	GII	2023
59	OR426514.1	GII	2023
60	OR447699.1	GII	2023
61	OR447700.1	GII	2023
62	OR447701.1	GII	2023

63	OR447702.1	GII	2023
64	OR447703.1	GII	2023
65	OR447704.1	GII	2023
66	OR447705.1	GII	2023
67	OR447706.1	GII	2023
68	OR447707.1	GII	2023
69	OR685664.1	GII	2023
70	OR685665.1	GII	2023
71	OR685666.1	GII	2023
72	OR717542.1	GII	2023
73	OR717543.1	GII	2023
74	OR717544.1	GII	2023
75	OR717545.1	GII	2023
76	OR717546.1	GII	2023
77	OR717547.1	GII	2023
78	OR751620.1	GII	2023
79	OR751621.1	GII	2023
80	OR794008.1	GII	2023
81	PP316687.1	GII	2024
82	PP316688.1	GII	2024
83	PP316689.1	GII	2024
84	PP316690.1	GII	2024
85	PP316691.1	GII	2024
86	PP316692.1	GII	2024
87	PP316693.1	GII	2024
88	PP316694.1	GII	2024
89	PP316695.1	GII	2024
90	PP406485.1	GII	2024
91	PP406486.1	GII	2024
92	PP406487.1	GII	2024
93	PP406488.1	GII	2024
94	PP406489.1	GII	2024
95	PP406490.1	GII	2024
96	PP406491.1	GII	2024

97	PP406492.1	GII	2024
98	PP406493.1	GII	2024
99	PP406494.1	GII	2024
100	PP406495.1	GII	2024
101	PP406496.1	GII	2024
102	PP406497.1	GII	2024
103	PP406498.1	GII	2024
104	PP406499.1	GII	2024
105	PP406500.1	GII	2024
106	PP486238.1	GII	2024
107	PP486239.1	GII	2024
108	PP486240.1	GII	2024
109	PP486241.1	GII	2024
110	PP486242.1	GII	2024
111	PP486243.1	GII	2024
112	PP486244.1	GII	2024
113	PP486245.1	GII	2024
114	PP486246.1	GII	2024
115	PP486247.1	GII	2024
116	PP486248.1	GII	2024
117	PQ596096.1	GII	2024
118	PQ596097.1	GII	2024
119	PQ596098.1	GII	2024
120	PQ596099.1	GII	2024
121	PQ596100.1	GII	2024
122	PQ596101.1	GII	2024
123	PQ596102.1	GII	2024
124	PQ596103.1	GII	2024
125	PQ596104.1	GII	2024
126	PQ596105.1	GII	2024
127	PQ596106.1	GII	2024
128	PQ596111.1	GII	2024
129	PQ596112.1	GII	2024
130	PQ596113.1	GII	2024

131	PQ596114.1	GII	2024
132	PQ596115.1	GII	2024
133	PQ596116.1	GII	2024
134	PQ596117.1	GII	2024
135	PQ596118.1	GII	2024
136	PQ596119.1	GII	2024
137	PQ596120.1	GII	2024
138	PQ596121.1	GII	2024
139	PQ596122.1	GII	2024
140	PQ596123.1	GII	2024
141	PQ596124.1	GII	2024
142	PQ596126.1	GII	2024
143	PQ596127.1	GII	2024
144	PQ596128.1	GII	2024
145	PQ596129.1	GII	2024
146	PQ596130.1	GII	2024
147	PQ596131.1	GII	2024
148	PQ596132.1	GII	2024
149	PQ596133.1	GII	2024
150	PQ596134.1	GII	2024
151	PQ596184.1	GI	2024
152	PQ614896.1	GI	2024
153	PQ614897.1	GI	2024
154	PQ780062.1	GI	2024
155	PQ780063.1	GI	2024
156	PQ780076.1	GII	2024
157	PQ780077.1	GII	2024
158	PQ780078.1	GII	2024
159	PQ780079.1	GII	2024
160	PQ780080.1	GII	2024
161	PQ780096.1	GII	2024
162	PQ780097.1	GII	2024
163	PQ780098.1	GII	2024
164	PQ803147.1	GII	2024

165	PQ803148.1	GII	2024
166	PQ803149.1	GII	2024
167	PQ803150.1	GII	2024
168	PQ803151.1	GII	2024
169	PQ803152.1	GII	2024
170	PQ803153.1	GII	2024
171	PQ803154.1	GII	2024
172	PQ803155.1	GII	2024
173	PQ803156.1	GII	2024
174	PQ804488.1	GII	2024
175	PQ804489.1	GII	2024
176	PQ804490.1	GII	2024
177	PQ804491.1	GII	2024
178	PQ804492.1	GII	2024
179	PQ804493.1	GII	2024
180	PQ804494.1	GII	2024
181	PQ804495.1	GII	2024
182	PQ804496.1	GII	2024
183	PQ804497.1	GII	2024
184	PV104188.1	GI	2024
185	PV104191.1	GII	2024
186	PV104192.1	GII	2024
187	PV104210.1	GII	2024
188	PV104211.1	GII	2024
189	PV104212.1	GII	2024
190	PV104213.1	GII	2024
191	PV104214.1	GII	2024
192	PV104278.1	GII	2024
193	PV104279.1	GII	2024
194	PV104280.1	GII	2024
195	PV104281.1	GII	2024
196	PV104282.1	GII	2024
197	PV104283.1	GII	2024
198	PV104287.1	GII	2024

199	PV104288.1	GII	2024
200	PV104289.1	GII	2024
201	PV104290.1	GII	2024
202	PV104291.1	GII	2024
203	PV104292.1	GII	2024
204	PV104293.1	GII	2024
205	PV104294.1	GII	2024
206	PV104295.1	GII	2024
207	PV104296.1	GII	2024
208	PV104297.1	GII	2024
209	PV104298.1	GII	2024
210	PV104299.1	GII	2024
211	PV104300.1	GII	2024
212	PV104301.1	GII	2024
213	PV104302.1	GII	2024
214	PV104303.1	GII	2024
215	PV104304.1	GII	2024
216	PV104305.1	GII	2024
217	PV104306.1	GII	2024
218	PV104307.1	GII	2024
219	PV104308.1	GII	2024
220	PV104309.1	GII	2024
221	PV104310.1	GII	2024
222	PV104311.1	GII	2024
223	PV104312.1	GII	2024
224	PV104313.1	GII	2024
225	PV104314.1	GII	2024
226	PV104315.1	GII	2024
227	PV104316.1	GII	2024
228	PV104317.1	GII	2024
229	PV104318.1	GII	2024
230	PV104319.1	GII	2024
231	PV104320.1	GII	2024
232	PV104325.1	GII	2024

233	PV104326.1	GII	2024
234	PV104327.1	GII	2024
235	PV104328.1	GII	2024
236	PV104329.1	GII	2024
237	PV104330.1	GII	2024
238	PV104331.1	GII	2024
239	PV104332.1	GII	2024
240	PV104333.1	GII	2024
241	PV104334.1	GII	2024
242	PV104335.1	GII	2024
243	PV104336.1	GII	2024
244	PV806172.1	GII	2024
245	PV806173.1	GII	2024
246	PV806174.1	GII	2024
247	PV746280.1	GII	2024
248	PV746278.1	GII	2024
249	PV746277.1	GII	2024
250	PV746276.1	GII	2024
251	PV746275.1	GII	2024