

На правах рукописи

БЫКОВ Роман Олегович

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

Специальность 1.5.10 – Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2026

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:	Семенов Александр Владимирович доктор биологических наук, директор ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора
Официальные оппоненты:	Ермоленко Константин Дмитриевич доктор медицинских наук, доцент, и.о. заместителя генерального директора по научной и образовательной деятельности, заведующий научно-исследовательским отделом кишечных инфекций ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России Козлов Константин Вадимович доктор медицинских наук, профессор, начальник кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропической медицины) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации
Ведущая организация:	Федеральное бюджетное учреждение науки «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится 3 ноября 2026 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета ДС 21.1.017.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17, Тел.: (812) 499 15 00

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДС 21.1.017.01 кандидат биологических наук Амосова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования:

Норовирусная инфекция человека (НВИ) – одна из ведущих причин острых инфекционных гастроэнтеритов. По оценкам ВОЗ, ежегодно регистрируется около 685 млн случаев инфицирования, а глобальный экономический ущерб достигает 60 млрд долл. США в год [Bartsch et al. 2016, Lorman et al. 2016, Mladenova et al. 2015].

Эпидемиологическая ситуация отличается высокой динамичностью, уровень заболеваемости варьирует от 534,3 на 100 тыс. в Юго-Восточной Азии до 1820,3 – в регионе Восточного Средиземноморья. В РФ и Свердловской области отмечается рост заболеваемости НВИ в постковидный период.

Возбудитель характеризуется генетическим разнообразием и высокой мутационной изменчивостью. Ключевую роль играет геногруппа GI, особенно генотип GI.4, штаммы которого вызывают глобальные вспышки по всему миру [Siebenga et al. 2007]. Однако региональная специфика (GI.17 в Азии, рекомбинантный GI.P16-GI.2 в Европе) указывает на возможность появления эмерджентных геновариантов, способных преодолевать иммунные барьеры [Bidalot et al. 2017, de Graaf et al. 2015]. Высокая частота рекомбинаций диктует необходимость совершенствования мониторинга генетического разнообразия. Отсутствие данных о генотипическом профиле возбудителей в регионах РФ, включая Свердловскую область, ограничивает возможности неспецифических профилактических мероприятий.

Значимым методологическим препятствием остается невозможность культивирования норовирусов на клеточных культурах, что исключает доступ к стандартизированным высококонцентрированным образцам вирусной РНК. В связи с этим разработка и унификация протоколов для высокопроизводительного секвенирования (NGS) приобретает критическую важность. Создание подобных актуализированных способов является необходимым условием для преодоления основного технического ограничения в данной области.

Современный подход к молекулярно-генетическому мониторингу подразумевает комплексное изучение как возбудителя, так и факторов восприимчивости макроорганизма. В частности, установлено, что невосприимчивость к норовирусу может иметь генетическую детерминанту, связанную с полиморфизмами в гене FUT2. Данный ген кодирует фермент альфа-1,2-фукозилтрансферазу 2, ответственный за синтез комплекса HBGAs (антигены группы крови человека), выступающего основным корцептором для реализации процессов адсорбции и последующей интернализации вирусной частицы в клетки-мишени [Ruvoën-Clouet et al. 2013]. Наличие хотя бы одного функционального аллеля FUT2 обуславливает синтез активного фермента и, как следствие, экспрессию рецепторов, что определяет фенотипическую восприимчивость индивида к норовирусной инфекции [Peña-Gil et al. 2021].

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

Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия норовирусов на территории Свердловской области и проведении анализа распространенности однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT, ответственных за формирование генетически детерминированной резистентности к норовирусу.

Задачи исследования:

- 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. Впервые для субъекта Уральского федерального округа адаптирован и внедрен комплексный алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов, включающий: формирование выборки образцов от больных норовирусным гастроэнтеритом, выделение РНК, ОТ-ПЦР, амплификацию фрагмента ORF1/ORF2 с модифицированным температурным профилем, секвенирование по Сэнгеру, полногеномное секвенирование (NGS), биоинформатическую обработку, статистический анализ и систематизацию нуклеотидных последовательностей с эпидемиологическими метаданными.

Для целей полногеномного анализа разработаны оригинальные высокоспецифичные протоколы подготовки NGS-библиотек на основе синтезированных панелей олигонуклеотидных праймеров. Их актуальность обусловлена отсутствием клеточной модели для культивирования

норовируса, что делает амплификацию РНК из клинических образцов основным путем получения полноразмерных геномов. Протоколы оптимизированы для работы с низкими концентрациями вирусной РНК и целенаправленного секвенирования геномов, доминирующих в регионе генотипов (GII.4[P16] и GII.7[P7]), обеспечивая преимущество в специфичности и полноте покрытия по сравнению с универсальными методами.

Впервые установлен и охарактеризован актуальный генотипический профиль норовирусов, циркулирующих на территории Свердловской области в 2022–2024 гг. Определены доминирующие и второстепенные генотипы, что позволило выявить особенности местной циркуляции популяции норовирусов, 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 эволюционных процессах в регионе.

Методом молекулярного моделирования выявлены структурно-функциональные аминокислотные замены в доменах главного капсидного белка VP1, которые, предположительно, способны способствовать повышению эпидемического потенциала циркулирующих норовирусов.

Впервые в практике российских исследований норовирусной инфекции применена комплексная оценка популяционной изменчивости генов FUT (фукозилтрансфераз) у добровольцев в городе Екатеринбурге. Получены данные о распространенности основных полиморфизмов, ассоциированных с потенциальной невосприимчивостью к норовирусу.

Теоретическая и практическая значимость. Адаптирован и апробирован алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов. Систематизированная коллекция последовательностей с эпидемиологическими метаданными и депонирование в GenBank гарантируют воспроизводимость филогенетического анализа и выявление предикторов изменчивости. Методология, апробированная в Свердловской области, может быть рекомендована для внедрения в систему молекулярно-эпидемиологического мониторинга других регионов УрФО.

Разработанные протоколы для секвенирования методом NGS впервые на территории УрФО позволили получить полноразмерные нуклеотидные последовательности генотипов GII.4[P16] и GII.7[P7], а также охарактеризовать мутационные события в гипервариабельных доменах полного гена VP1, которые обладают высокой значимостью ввиду их участия в процессах иммунного ответа и адсорбции норовируса к клетке-мишени.

Впервые для Свердловской области выявлены локальные генетические кластеры. Полученные результаты формируют основу для регионального эпидемиологического прогнозирования, позволяя отслеживать появление и распространение эмерджентных геновариантов с высоким эпидемическим потенциалом для своевременного информирования органов Роспотребнадзора.

Методами молекулярного моделирования определены функционально-значимые аминокислотные замены в белке VP1. Описана их потенциальная роль в изменении антигенных свойств и аффинности связывания с рецепторами и иммунными клетками. Результаты расширяют представления о молекулярных детерминантах патогенности и могут служить основой для целенаправленного отбора регионально-релевантных генотипов при создании диагностических и вакцинных препаратов.

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 GII над геногруппой GI 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 GII.4[P16] и рекомбинантного GII.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 путем определения их SNP-профиля.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 9 научных форумах, в том числе: Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (СПб, 2023); Международная конференция «Актуальные вопросы современной медицинской науки» (Екатеринбург, 2023); Международная конференция молодых ученых «Open Bio» (Кольцово, 2023); Российский диагностический Саммит (Москва, 2023); XVI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Екатеринбург, 2024); Конгресс по инфекционным болезням им. В.И. Покровского (Москва, 2024); конференция «Вирусные инфекции в XXI веке» (Екатеринбург, 2025); конференция по эпидемиологии в ВС РФ (Екатеринбург, 2025); Конгресс молодых ученых (Сочи, 2025).

Публикации. 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 и докладов на российских и международных научных конференциях.

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).

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания на тему «Мониторинг циркуляции и генетического разнообразия возбудителей норовирусной инфекции» (№ 123051100045-0).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологические образцы. В период с февраля 2022 г. по декабрь 2024 г. в Свердловской области (Екатеринбург, Каменск-Уральский, Нижний Тагил и др.) проведен сбор нативного фекального материала от 894 пациентов с подтвержденным диагнозом «норовирусный гастроэнтерит» (МКБ-10: A08.1). Верификация выполнена методом ИФА («Вектор-Бест») и/или ПЦР-РВ (Центральный НИИ эпидемиологии). Все случаи спорадические, не связанные с эпидемическими очагами. Транспортировка и хранение материала осуществлялись по СанПиН 3.3686-21. От всех пациентов получено информированное согласие.

Для анализа полиморфизмов FUT1/FUT2 сформирована группа из 265 добровольцев старше 18 лет без норовирусного гастроэнтерита в анамнезе. Забор крови проведен на базе ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора. Все участники дали информированное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФБУН ФНИИВИ «Виром» (Протокол № 1 от 17.03.2022).

Алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов. Адаптация алгоритма заключалась в модификации протоколов амплификации, разработке протокола обогащения для NGS и унификации биоинформатической обработки нуклеотидных данных. При выполнении работы соблюдалась необходимая этапность всех процедур (рис. 1).



Рисунок 1. Алгоритм молекулярно-генетического мониторинга норовирусов

Выделение нуклеиновой кислоты норовирусов и генов FUT, ПЦР, секвенирование методом Сэнгера. Из фекальных образцов выделяли тотальную РНК набором «РИБО-преп®» (ЦНИИЭ). Обратную транскрипцию проводили набором «РЕВЕРТА-Л» (ЦНИИЭ) на амплификаторе Applied Biosystems Veriti®. Для амплификации фрагмента ORF1/ORF2

использовали праймеры MON432/GISKR (GI) и MON431/GIISKR (GII). Реакционная смесь содержала 5X ScreenMix-HS, праймеры (20 пмоль/л) и деионизированную воду.

Референсный протокол амплификации (MP 4.4/3.1.1.0230–21) модифицирован: предварительная денатурация – 95°C, 5 мин (вместо 15 мин); 45 циклов (вместо 40): 94°C – 30 с, 51°C – 30 с, 72°C – 1 мин; финальная элонгация – 72°C, 7 мин (вместо 2 мин). Сокращение времени начальной денатурации снижает деградацию РНК и уменьшает время анализа, увеличение числа циклов повышает чувствительность при низкой вирусной нагрузке, повышение температуры отжига до 51°C увеличивает специфичность, удлинение финальной элонгации обеспечивает получение ампликонов, оптимальных для секвенирования. Параметры универсальны для амплификаторов различных типов.

Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле, очищали набором Cleanup Standard и секвенировали на ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) набором BrilliantDye™ Terminator v3.1.

Для изучения генов FUT из крови с ЭДТА выделяли лейкоцитарную фракцию центрифугированием (400×g, 30 мин) с трехкратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере. Для анализа полиморфизмов FUT1/FUT2 использовали праймеры, фланкирующие второй экзон. Методом градиентной ПЦР (52-62°C) определена оптимальная температура отжига 58°C. ПЦР проводили при 95°C – 5 мин, 40 циклов: 95°C – 5 с, 58°C – 5 с, 72°C – 30 с. Продукты очищали и секвенировали по аналогичному протоколу.

Разработка оригинального протокола обогащения нуклеиновых кислот генотипов GI.4[P16], GI.7[P7] для реализации последующего секвенирования методом NGS. Разработан оригинальный протокол обогащения норовирусной РНК для полногеномного секвенирования на основе панели специфичных олигонуклеотидов, фланкирующих полноразмерный геном доминирующих в регионе генотипов GI.4[P16] и GI.7[P7]. Для каждого генотипа синтезированы перекрывающиеся праймеры (800-1000 п.н.), дизайн которых выполнен в Primer3 с проверкой специфичности *in silico*. Протокол валидирован на 10 контрольных образцах по критериям: наличие специфичных ампликонов ожидаемого размера, концентрация ДНК >20 нг/мкл, покрытие генома ≥95% и глубина прочтения ≥50×.

Проведение секвенирования нуклеотидных последовательностей полноразмерных норовирусных геномов методом next-generation sequencing (NGS). Тотальную РНК выделяли из фекальных суспензий набором ExtractRNA («Евроген»). Синтез кДНК и амплификацию проводили по модифицированному протоколу SMART-9N с праймерами ONT-RT-9N и ONT-TSO, набором «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» и ПЦР-смесью «БиоМастер LR HS-ПЦР» (Биолабмикс). Продукты очищали на магнитных частицах VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme). Одноэтапную ОТ-ПЦР проводили с набором «Биолабмикс-премиум» и пулами праймеров.

Ампликоны очищали на магнитных частицах. Концентрацию ДНК измеряли на Qubit 4.0 с набором dsDNA HS Assay Kit. Образцы с концентрацией >20 нг/мкл пулировали. Секвенирование выполнено на платформе Illumina MiSeq.

Биоинформационная обработка нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома, полноразмерных геномов норовирусов. Первичную идентификацию нуклеотидных последовательностей норовирусов проводили в BLAST (NCBI). Консенсусные последовательности собирали в UGENE (v.51) сопоставлением прямых и обратных прочтений с референсами NCBI. Сборку полноразмерных геномов из данных NGS выполняли в DRAGEN (v.4.3). Полиморфизмы FUT1/FUT2 анализировали выравниванием с референсами в MEGA (v.11) и сборкой консенсуса в UGENE.

Применение алгоритмов множественного выравнивания, филогенетический анализ, построение матрицы генетических дистанций. Множественное выравнивание выполняли алгоритмом ClustalW. Филогенетические деревья реконструировали методами Maximum Likelihood и Neighbor-joining по модели Kimura 2-parameter с бутстрепом (1000 повторов). Генетические дистанции оценивали по p-distance матрице на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Локализацию аминокислотных замен визуализировали в SWISS-MODEL.

Референсные последовательности отобраны из GenBank (верификация в BLAST NCBI) с указанием Accession Numbers и географического происхождения. Генетическую дивергенцию фрагмента ORF1/ORF2 оценивали методом p-distance (MEGA v.11), генотипы определяли по кластеризации с референсами (бутстрэп >70%). Градация дивергенции: 2-5% – низкая, 5-10% – средняя, более 10% – высокая. Для полноразмерных геномов дивергенция менее 5% по VP1 – внутригенотипическая, 10-20% – высокая.

Используемые статистические методы обработки данных. Для статистического анализа применяли критерий χ^2 Пирсона с post-hoc тестированием и модель Пуассона (программы IBM SPSS Statistics, R). Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера для каждого SNP. Рекомбинационный анализ выполнен в SimPlot (v.2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Проанализировано 894 образца от больных норовирусным гастроэнтеритом, методом Сэнгера типировано 416 последовательностей (47%). Доля GII составила 90%, GI – 10%, что

соответствует мировым данным. Отмечена смена доминирующих генотипов: в 2022 г. – GII.17[P17] (42%) и GI.3[P13] (22%); в 2023 г. – GII.4[P16] (48%) и GII.17[P17] (28%); в 2024 г. – GII.4[P16] (40%) и GII.7[P7] (39%). Доля GII.17[P17] снизилась до 6%. Выявляемость норовируса возросла с 33% (2022) до 56% (2024).

В динамике отмечена последовательная смена лидирующих генотипов (GII.4[P16], GII.7[P7], GII.17[P17]) (рис. 2). В 2024 г. впервые идентифицированы ранее не регистрировавшиеся в области капсидные и полимеразные типы GI, такие как: GI.7[P7], GI.6[P11], GI.2[P2], что может указывать на завозные случаи. Также зафиксированы менее распространенные генотипы, относящиеся к геногруппе GII (GII.6[P7], GII.8[P8], GII.3[P12] и др.).

Для оценки динамики генотипической структуры норовирусов (2022-2024) применен критерий χ^2 Пирсона. Распределение генотипов по годам неслучайно ($\chi^2 = 99,87$, $df = 4$, $p < 0,001$), что подтверждает статистически значимую динамику циркулирующих генотипов. Выявленное доминирование GII и смена ведущих генотипов свидетельствуют о высокой динамичности эпидемического процесса. Результаты обосновывают необходимость непрерывного молекулярно-генетического мониторинга для выявления новых линий, оценки их эпидемического потенциала и прогнозирования ситуации.

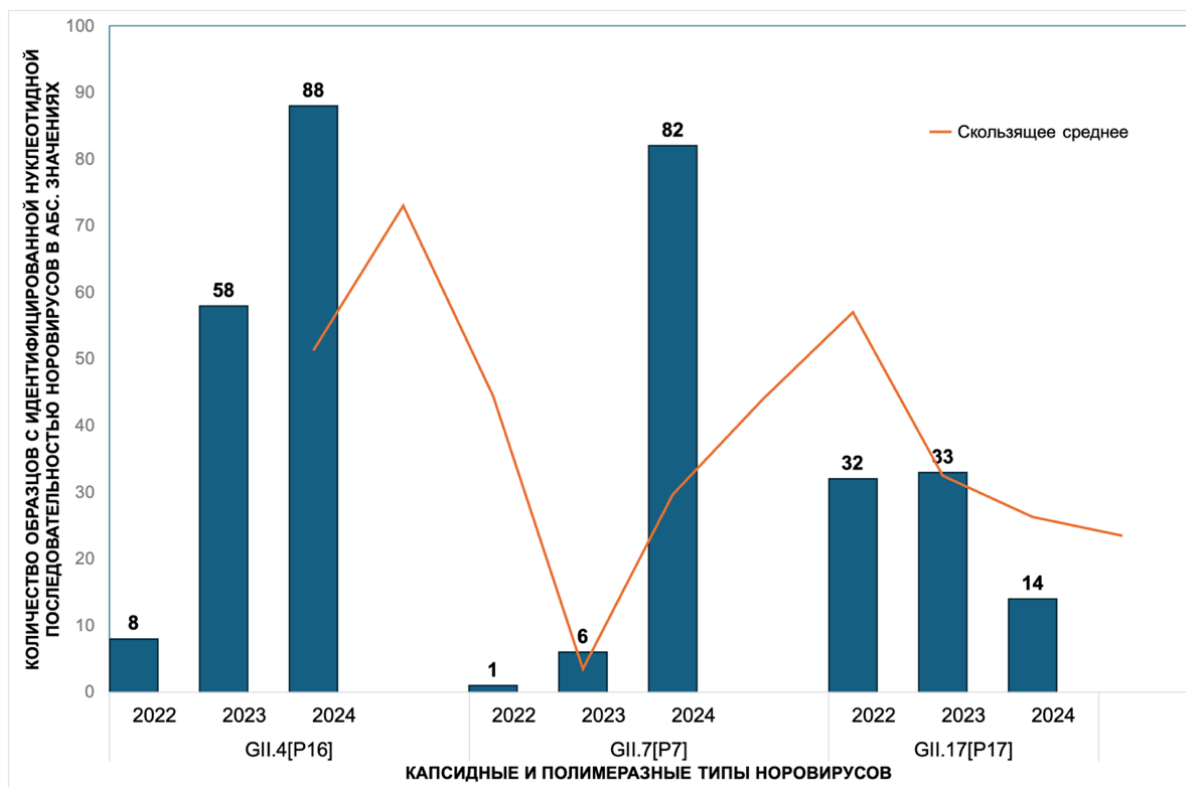


Рисунок 2. Динамика распределения доминирующих генотипов норовирусов геногруппы GII (по капсидному и полимеразному типу) на территории Свердловской области, 2022-2024 гг.

Для статистической верификации возрастных паттернов применен регрессионный анализ по модели Пуассона с фиксированными эффектами (рис. 3). В группе 0-2 года выявлен экспоненциальный рост частоты обнаружения для GII – прирост 200% ($p < 0,001$) и GI – 100% ($p = 0,18$). В группах 3-10 лет и 11-17 лет для GII отмечен спад на 24,41% ($p < 0,001$) и 23,22% ($p = 0,002$); динамика GI статистически незначима. В группах 18-50 лет и старше частота стабильна. Данные подтверждают наибольший риск инфицирования GII у детей первых лет жизни, что определяет необходимость проведения надзора и профилактики в детских дошкольных учреждениях и педиатрических стационарах.

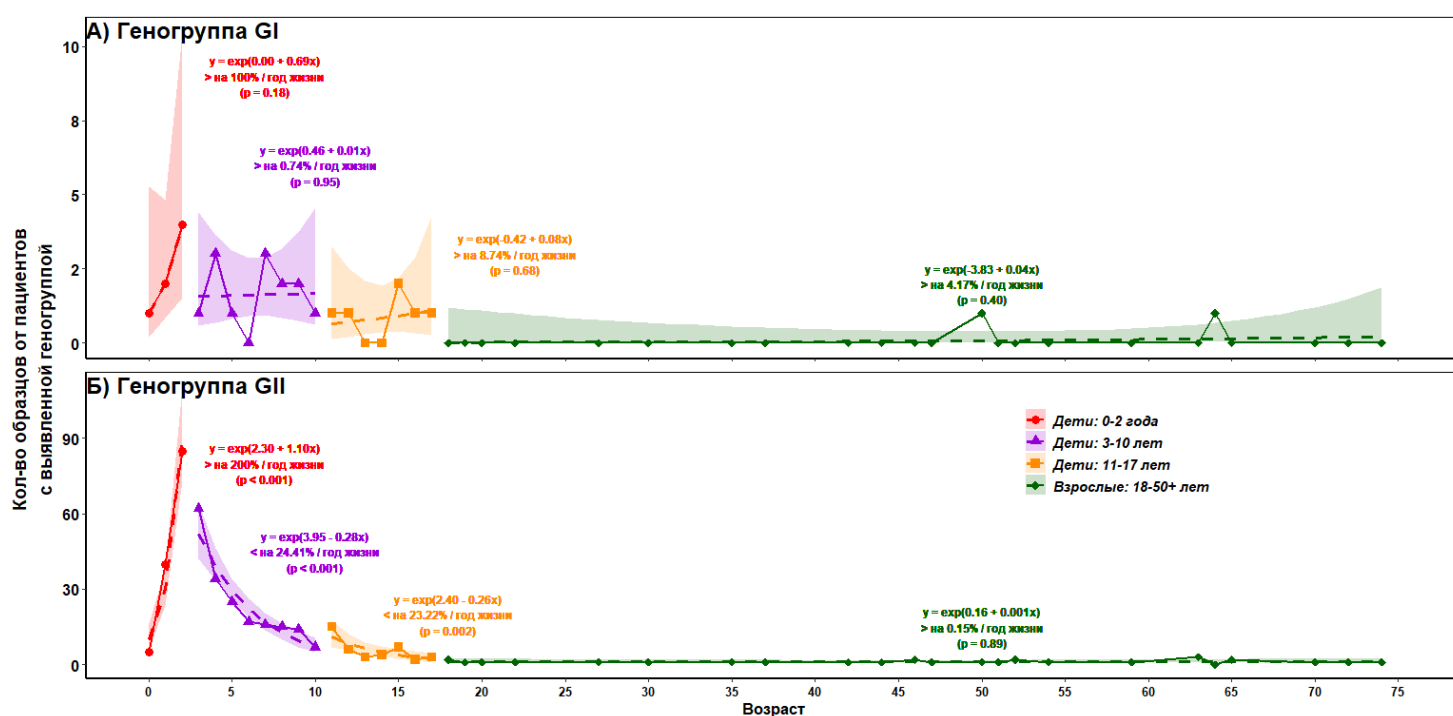


Рисунок 3. Аппроксимация частоты обнаружения норовирусных геногрупп GI-GII в различных возрастных группах

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента ORF1/ORF2 норовирусного генома.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей GII.4[P16] выявил общее происхождение локальных вариантов из Каменск-Уральского и Екатеринбурга. Большинство нуклеотидных последовательностей норовирусов за период исследования не претерпели значительных эволюционных изменений и обладали высокой степенью идентичности (96-100%). Топология дерева характеризуется обособленными терминальными узлами, что может быть связано с низким филогенетическим сигналом из-за высокой идентичности последовательностей. При этом идентифицированы отдельные дивергентные генотипы из Екатеринбурга

(GII.4[P16]/4/24, /1276/24, /251/24) с уровнем генетической дивергенции 8-12% по сравнению с остальными (рис. 4).

Установлены парафилетические связи генотипов из Свердловской области с рекомбинантами GI.4[P16] из Бразилии и Японии (идентичность 96-98%), что согласуется с данными о глобальном распространении данного варианта, детектированного с 2016 г., и его вероятной интродукции в Россию в 2016-2017 гг.

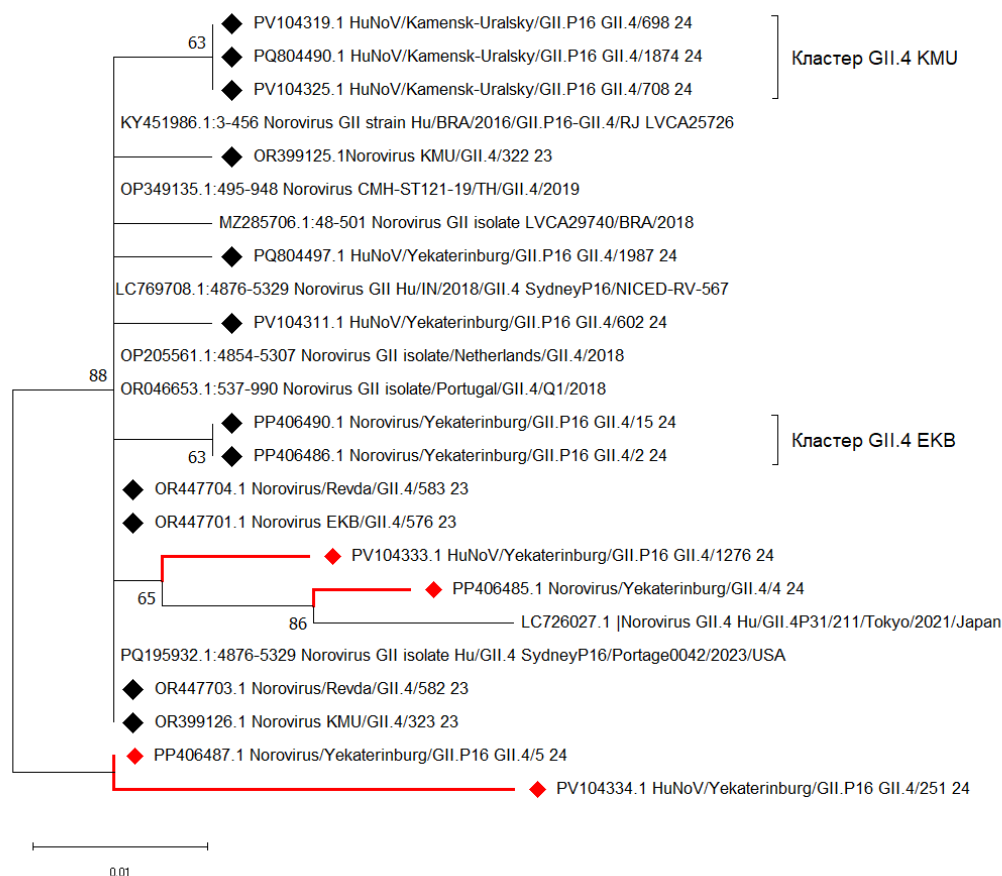


Рисунок 4. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GI.4[P16] за 2023-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные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

Последовательности GI.7[P7] из Свердловской области образуют единый кластер (генетическая дистанция 0-2%) (рис. 5). Кластер образует обособленный узел, отделенный от внешней группы из Бразилии, Индонезии, Индии и других стран, с уровнем дивергенции 5-29%. Высокодивергентные нуклеотидные последовательности из Каменск-Уральского (GI.7[P7]/159/24, /154/24). Изолированная клада с дивергенцией до 37% подтверждает локальную циркуляцию и возможную эволюцию GI.7[P7] в области, что согласуется с ростом его заболеваемости в России в 2024 году.

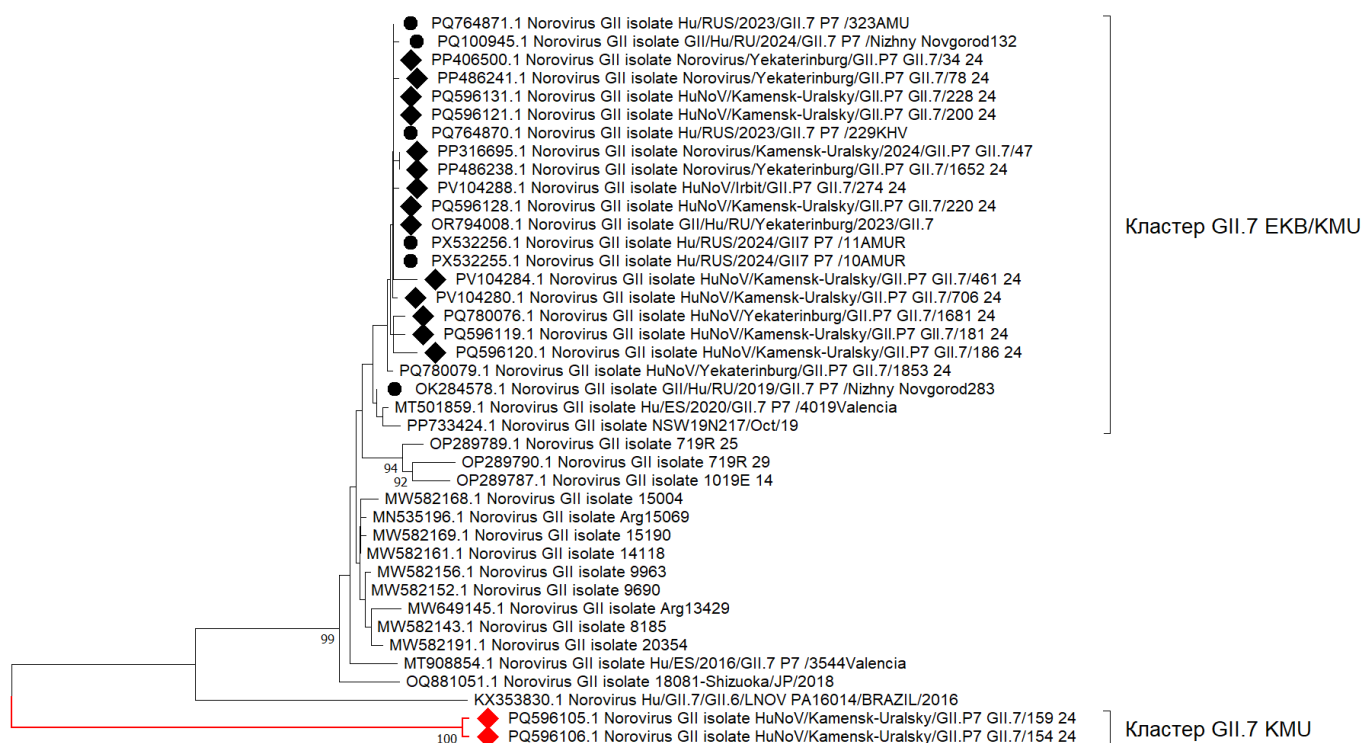


Рисунок 5. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GII.7[P7] за 2023-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл., черным кругом представлены генотипы из Нижнего Новгорода и Хабаровска)

Нуклеотидные последовательности GII.17[P17] из муниципалитетов Свердловской области (Екатеринбург, Нижний Тагил, Сухой Лог, Каменск-Уральский) формируют общий кластер с высокой степенью идентичности (генетическая дистанция 0-4%) (рис. 6). Данный кластер образует обособленный внутренний узел и демонстрирует полифилетические связи с вариантами из Японии, Китая, Бразилии и России, подтверждая их широкое географическое распространение. Наибольшая дивергенция (14%) наблюдается с генотипами из Бангладеш. Высокая степень идентичности (0-3%) с штаммами из Восточной Азии (Япония, Китай), включая штамм Kawasaki, может свидетельствовать об их общей филогенетической линии и эндемичной циркуляции на территории области.

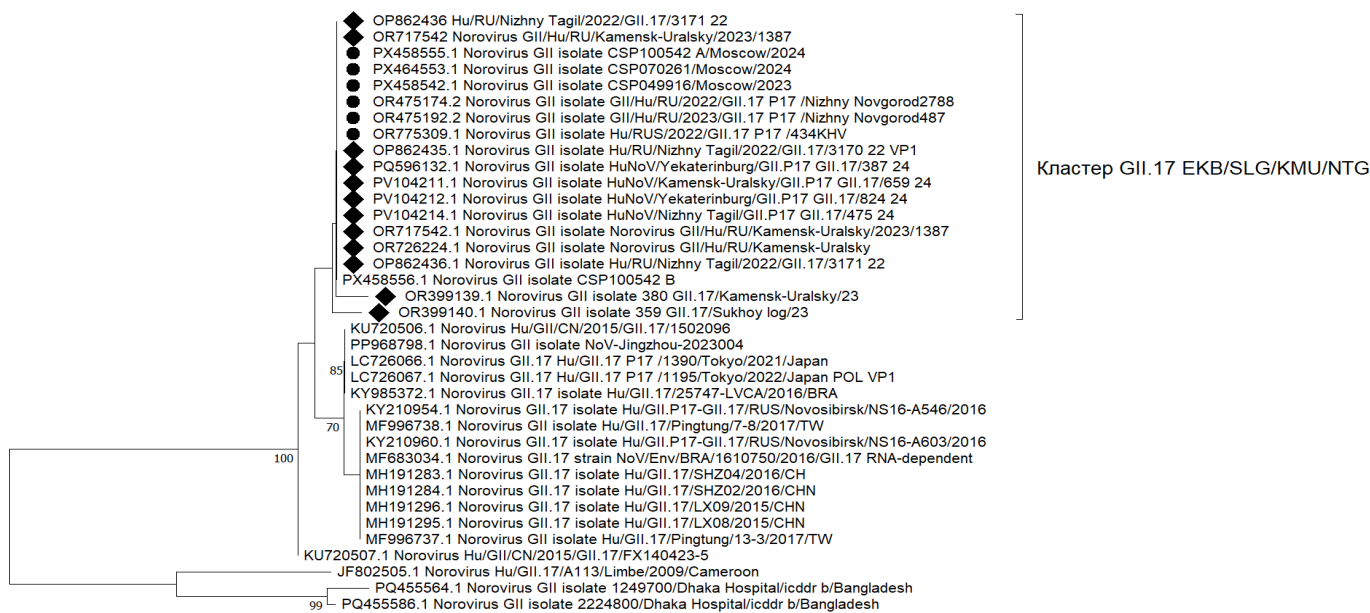


Рисунок 6. Реконструкция филогенетических событий нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1/RdRp генотипа GII.17[P17] за 2022-2024 гг. при использовании двухпараметрической модели Kimura 2-parameter model (черным ромбом представлены генотипы из Свердловской обл., красным ромбом представлены дивергентные генотипы из Свердловской обл., черным кругом представлены генотипы из Нижнего Новгорода и Хабаровска, Москвы)

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

Проведен анализ аминокислотных последовательностей фрагмента главного капсидного белка VP1 доминирующих генотипов (GII.4[P16], GII.7[P7], GII.17[P17]). Установлено, что у большинства аминокислотных последовательностей всех трех генотипов мутационные события представлены преимущественно синонимичными заменами. У каждого генотипа идентифицированы редкие несинонимичные замены, локализованные в консервативном S-домене, ответственном за формирование внутренней оболочки капсида. На примере генотипа RU/SVE/GII.7[P7]/90/2024 обнаружено около 5 мутационных событий (рис. 7). Полученные данные указывают на возможность накопления аминокислотных замен в структурно-консервативных регионах VP1, что определяет важность мониторинга таких эволюционных событий. Для более глубокого понимания механизмов изменчивости требуется дальнейшее секвенирование полного гена VP1.

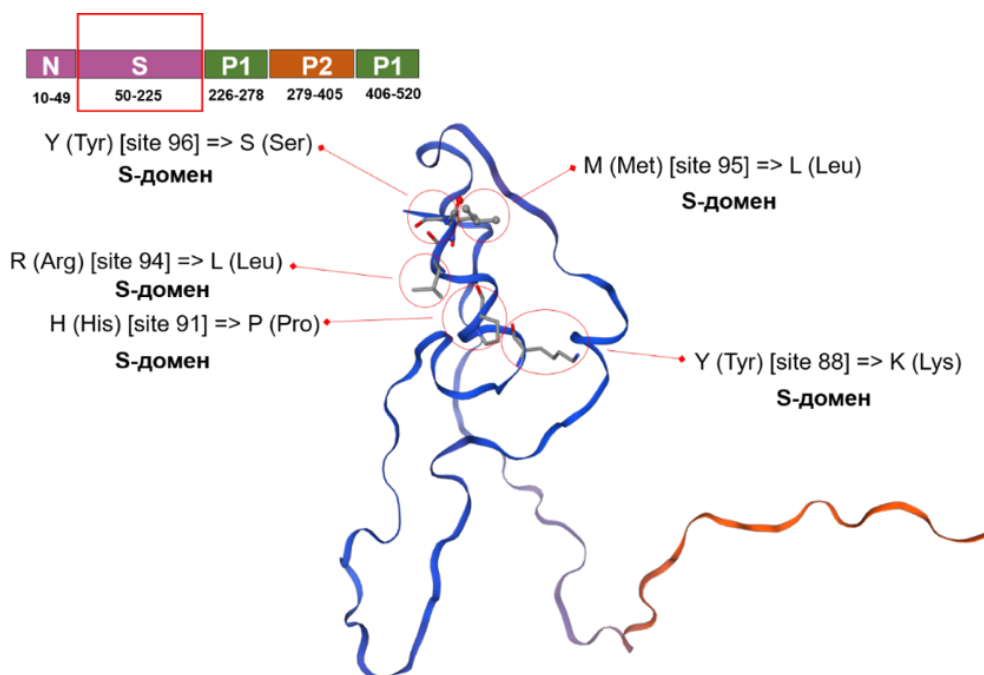


Рисунок 7. Реконструкция 3D-модели несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях фрагмента структурного белка VP1 норовирусного генотипа RU/SVE/GII.7[P7]/90/2024 из Свердловской области (3D визуализация несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении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

Идентификация полноразмерных геномов норовирусов, входящих в состав преобладающего генотипического профиля, при использовании секвенирования методом NGS.

Методом NGS из выборки образцов 2024 г. (n=10) получено 8 полноразмерных геномов GII.4[P16] и GII.7[P7]. Среднее покрытие составило 603× и 246× соответственно. Филогенетический анализ GII.4[P16] выявил два кластера с последовательностями из Свердловской области и полифилетические связи с вариантами из Нижнего Новгорода, США, Индии и Японии. Генетическая дистанция между локальными генотипами составила 1-2%, с зарубежными – 3-5% (рис. 8).

Геномы GII.7[P7] образовали общую кладу с последовательностями из Нижнего Новгорода и филогенетические связи с японскими. Идентифицирован уникальный вариант PV746280.1 с генетической дистанцией 24-35% от других локальных GII.7[P7] (рис. 9).

Данные свидетельствуют о множественных интродукциях и активной локальной эволюции доминирующих генотипов. Выявлены как глобально распространенные линии, так и уникальные, сформировавшиеся на территории Свердловской области, что указывает на наличие автономных эволюционных очагов. Обнаруженные уникальные линии могут обладать отличительными биологическими свойствами и влиять на эпидемический процесс, что требует их учета в системе эпидемиологического надзора.

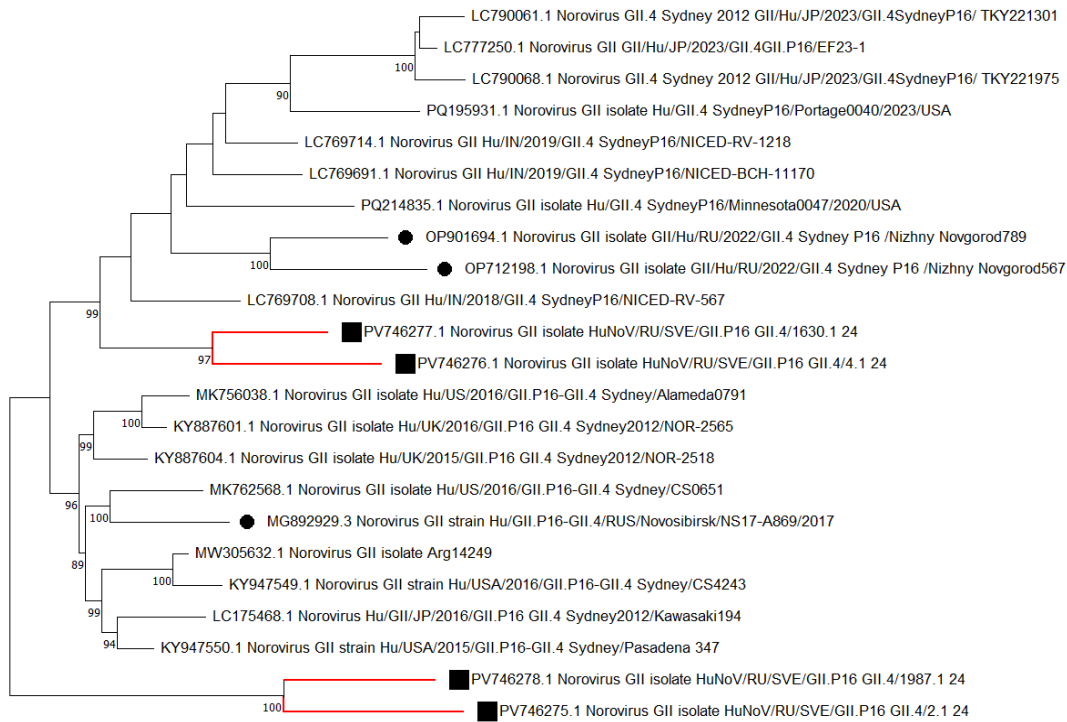


Рисунок 8. Аддитивная филограмма нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.4 (черный квадрат – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территории Свердловской области в 2024 г.; черный круг – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.4, идентифицированные на территориях других областей России за разные аналитические периоды)

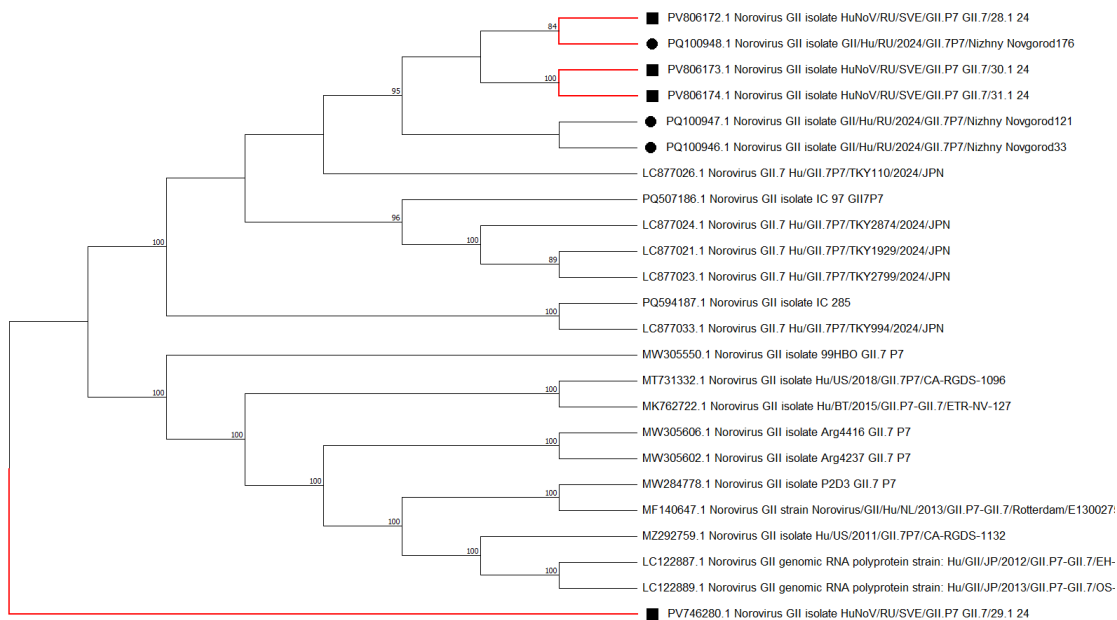


Рисунок 9. Кладограмма нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов норовирусов GII.7 (черный квадрат – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.7, идентифицированные на территории Свердловской области в 2024 г.; черный круг – полноразмерные последовательности генома норовирусов GII.7, идентифицированные на территориях других областей России за 2024 год)

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

Анализ полноразмерных генов VP1 выявил ключевые аминокислотные замены в капсидном белке (рис. 10). У GII.4[P16] идентифицированы четыре несинонимичные замены: H297R и N372D – в эпитопе А, V317I – в субдомене P2, ответственном за связывание с рецептором. Это свидетельствует об активном антигенном дрейфе локальных вариантов GII.4[P16].

У последовательностей генотипа GII.7[P7] обнаружены замены M237K – P1 домен и G171S – S домен (рис. 11). Высокая идентичность (98-99%) с последовательностями из Японии и Нижнего Новгорода указывает на завозной характер данного генотипа. Исключение составляет – генетический вариант PV746280.1 с генетической дистанцией 24-35% от других GII.7[P7]. Подтверждена глобальная циркуляция GII.4[P16]. Полученные данные указывают на два различных пути эволюции циркулирующих генотипов. Для GII.4[P16] характерна локальная адаптация с постепенным накоплением замен, тогда как появление GII.7[P7], вероятно, связано с завозом вируса на территорию региона.

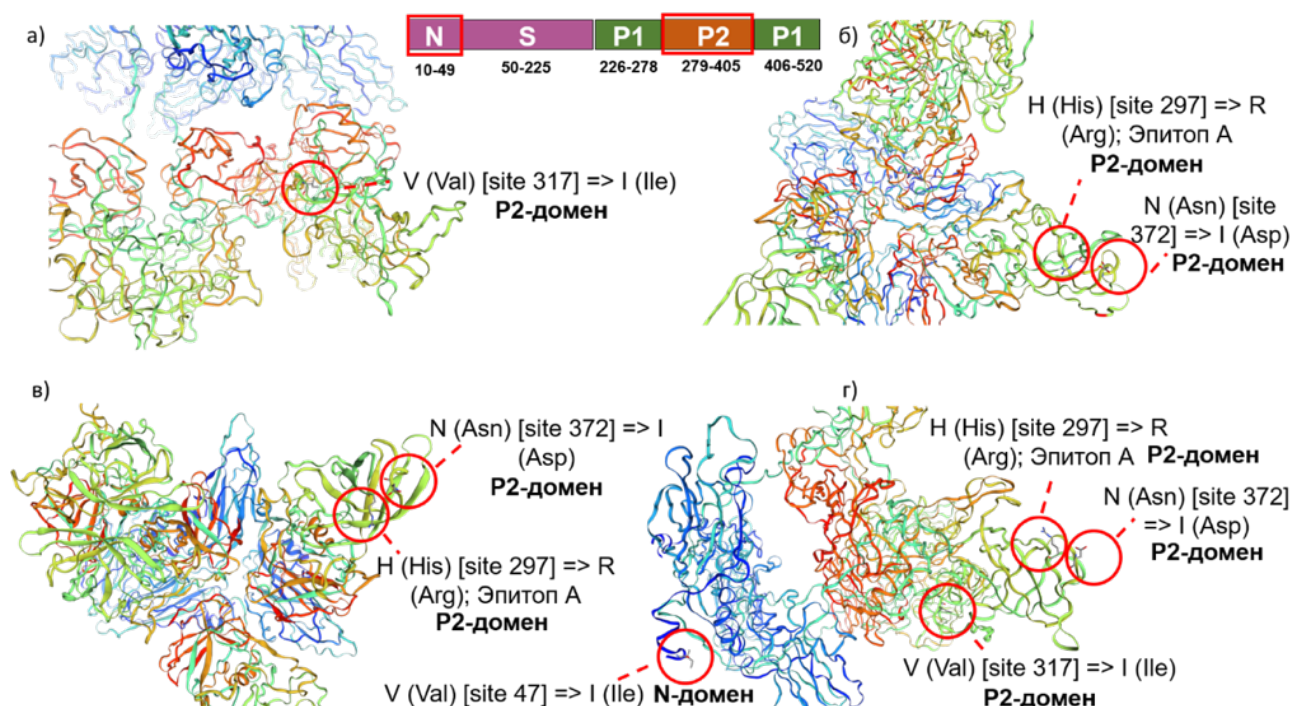


Рисунок 10. Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях главного структурного белка VP1 норовирусов GII.4 из Свердловской области (а. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.4[P16]/2/2024; б. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.4[P16]/4/2024; в. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.4[P16]/1630/2024; г. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.4[P16]/1987/2024; 3D визуализация синонимичных/несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

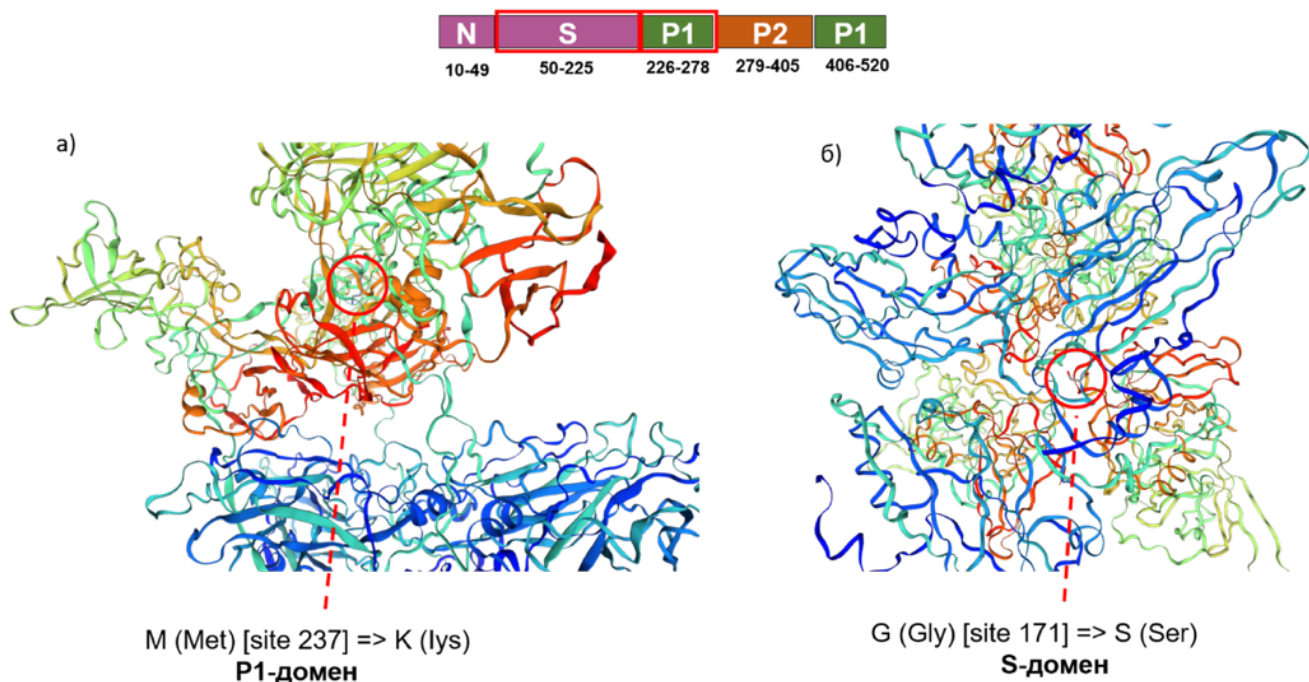


Рисунок 11. Реконструкция 3D-моделей несинонимичных замен в аминокислотных последовательностях главного структурного белка VP1 норовирусов GII.7 из Свердловской области (а. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.7[P7]/28/2024; б. – несинонимичные замены в белке VP1 RU/SVE/GII.7[P7]/30/2024; 3D визуализация синонимичных/несинонимичных замен в структуре полипептидов осуществлялась в клиент-серверном приложении SWISS-MODEL)

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

Для оценки событий рекомбинации проведен анализ генетической дистанции между генотипами GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода и Токио. Установлена высокая степень генетической идентичности (99-100%) на протяжении всей полноразмерной геномной последовательности, что подтверждает их наименьшую генетическую дистанцию (рис.12).

С использованием трех статистических критериев (PHI-тест, Max Chi², тест NSS) достоверно подтверждено рекомбинационное событие между японскими последовательностями GII.6[P7] и GII.7[P7] с точкой обмена в гене ORF2, кодирующем главный капсидный белок VP1.

Генетическая идентичность локальных генотипов с последовательностями из Японии, в совокупности с подтвержденной рекомбинационной изменчивостью, является молекулярно-эпидемиологическим свидетельством в пользу гипотезы о завозе эмерджентного рекомбинантного GII.7[P7] на территорию Российской Федерации в 2023-2024 гг. Циркуляция данного варианта, к которому отсутствует популяционный иммунитет, объясняет высокий уровень заболеваемости в указанный период.

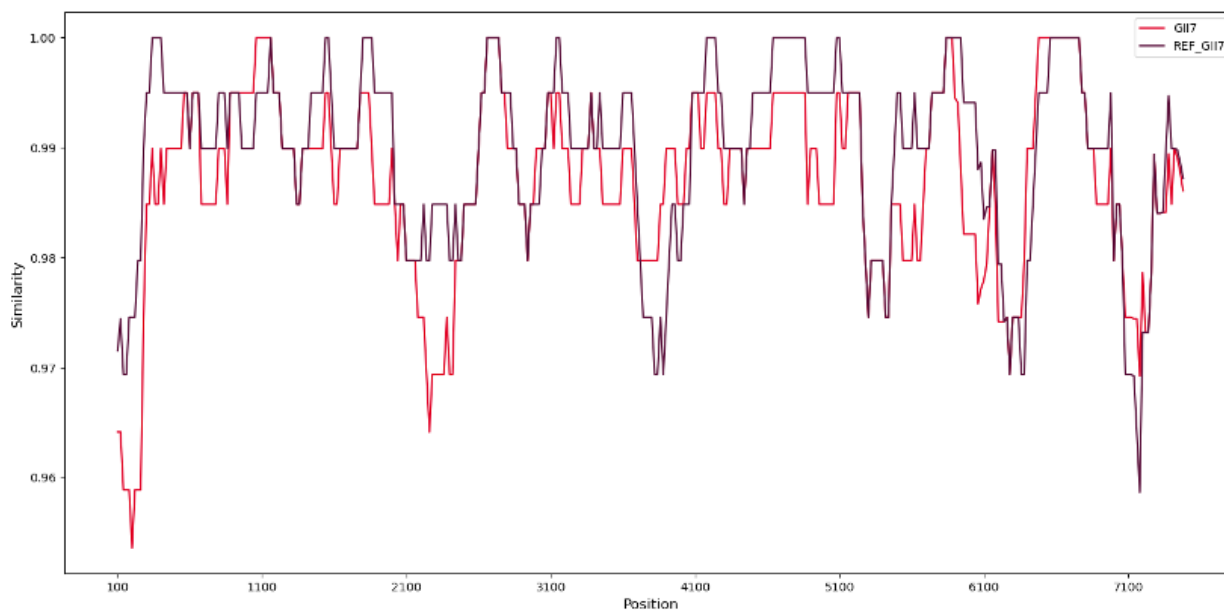


Рисунок 12. Генетическая дистанция полноразмерных нуклеотидных последовательностей GII.7[P7] из Свердловской области, Нижнего Новгорода, Токио. (Иллюстрация создана при помощи Simplot software)

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT в популяции добровольцев в г. Екатеринбург за аналитический период 2024 г.

Впервые на территории Уральского региона проведен анализ распространенности генетических факторов восприимчивости к норовирусной инфекции. Определены спектр SNP в генах FUT1 и FUT2 у добровольцев Екатеринбурга (n=265). Данные гены кодируют $\alpha(1,2)$ -фукозилтрансферазы – ключевые ферменты синтеза комплекса антигенов HBGAs, выполняющих функцию ко-рецептора для норовируса. Мутации, нарушающие работу этих генов, обуславливают несекреторный фенотип и генетическую резистентность.

Идентифицировано 24 SNP, из которых 13 – потенциально способны обуславливать генетически детерминированную резистентность к норовирусу (табл. 1). В FUT1 обнаружены миссенс-мутации (с.422G>C, p.Cys141Ser; с.293C>T, p.Thr98Met), стоп-кодон (с.695G>A, p.Arg) и делеция (с.551_552delAG), сочетание которых в гомозиготе проявляется фенотипом «пара-Бомбей». В FUT2 выявлены миссенс-мутации (с.385A>T, p.Ile129Phe; с.529A>T, p.Ile177Phe) и стоп-кодон (с.572G>A, p.Ser), приводящие к несекреторному статусу, а также синонимичные замены.

Таким образом, впервые для Уральского региона выявлен спектр SNP в генах FUT1/FUT2, детерминирующих несекреторный фенотип. Внедрение данного анализа в систему эпидемиологического надзора позволит оценивать долю резистентных лиц, а также индивидов, более подверженных инфицированию, что в дальнейшем создаст основу для разработки эффективных профилактических стратегий и управления инфекционным заболеванием.

Комплексный мониторинг возбудителя и генетических особенностей популяции хозяина представляет собой современный подход к предиктивному контролю инфекции.

Таблица 1. Генетический профиль идентифицированных однонуклеотидных полиморфизмов в генах FUT1/FUT2 в г. Екатеринбурге у популяции добровольцев за аналитический период 2024 г.

Ген	SNP	Тип мутации	Фенотипический эффект (число носителей)
FUT2	c.624 C>T	Синонимичная	– (1)
FUT2	c.501 T>C	Синонимичная	– (4)
FUT2	c.529 A>T	Миссенс	– (1)
FUT2	c.572 G>A	Стоп-кодон	Несекреторный (4)
FUT2	c.385 A>T	Миссенс	– (1)
FUT2	c.390 C>T	Синонимичная	– (3)
FUT2	c.513 C>T	Синонимичная	– (1)
FUT2	c.390 C>T; c.513 C>T	Синонимичные (комбинация)	– (2)
FUT1	c.422 G>C	Миссенс	пара-Бомбей (1)
FUT1	c.293 C>T	Миссенс	пара-Бомбей (2)
FUT1	CAGAGAG>CAGAG	Делеция	пара-Бомбей (2)
FUT1	c.695 G>A	Стоп-кодон	Несекреторный; пара-Бомбей (2)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведен молекулярно-эпидемиологический и эволюционный анализ норовирусов в Свердловской области (2022-2024 гг.). Установлены закономерности циркуляции и эволюции возбудителя, исследованы генетические факторы восприимчивости популяции.

Доказано доминирование GII (90%) и выявлена смена ведущих генотипов. Филогенетический анализ подтвердил глобальную циркуляцию GII.4[P16] и показал интродукцию GII.7[P7] с высокой идентичностью последовательностям из Нижнего Новгорода и Японии. Продемонстрирована рекомбинантная природа GII.7[P7] с точкой обмена в гене VP1.

Впервые для региона проведен анализ полиморфизмов FUT1/FUT2, выявивший мутации, ассоциированные с несекреторным фенотипом. Разработаны протоколы полногеномного секвенирования норовирусов из клинических образцов.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования

На основании результатов сформулированы перспективные направления: создание региональной базы полных геномов, внедрение алгоритма реагирования на новые рекомбинантные варианты, экспериментальная оценка мутаций возбудителя, масштабный скрининг FUT, учет циркулирующих вариантов при разработке вакцин. Исследование закладывает основу для перехода к проактивному эпидемиологическому надзору, основанному на понимании ко-эволюции возбудителя и хозяина.

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 филогенетических 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 GII.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 создает основу для дальнейших популяционных и ассоциативных исследований по оценке вклада генетической изменчивости хозяина в восприимчивость к норовирусной инфекции.

СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год / **Быков Р.О.**, Скрябина С.В., Килячина А.С., Итани Т.М., Чалапа В.И., Старикова П.К., Колтунов С.С., Пономарева А.В., Семенов А.В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т.100, №4. – С. 306-313. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-402>
- 2) Изучение аспектов формирования генетически детерминированной резистентности к возбудителю норовирусной инфекции посредством полиморфизма гена FUT2 / **Быков Р.О.**, Семенов А.В., Старикова П.К., Итани Т.М. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2023. – Т. 22, №6. – С. 148-154. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-6-148-154>
- 3) Анализ генетического разнообразия норовирусов (Caliciviridae, Norovirus) на территории отдельных муниципалитетов Свердловской области за 2022–2024 гг.»/ **Быков Р.О.**, Чалапа В.И., Итани Т.М., Имангалиев Б.С., Скрябина С.В., Килячина А.С., Пономарева А.В., Романов С.В., Семенов А.В.) // Инфекционные болезни. – 2025. – Т.23, № 1 . – С. 55-64. [10.20953/1729-9225-2025-1-55-64](https://doi.org/10.20953/1729-9225-2025-1-55-64)
- 4) Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Human Norovirus Sequences Derived from Municipalities within the Sverdlovsk Region of Russia / **Bykov R.**, Itani T., Starikova P., Scriabina S., Kilyachina A., Koltunov S., Romanov S., Semenov A. // Viruses. – 2024. – Vol. 16, Iss. 7. – Art. No.1001. <https://doi.org/10.3390/v16071001> (Q1).
- 5) Molecular Characterization and Epidemiology of Human Noroviruses in the Sverdlovsk Region, Russian Federation / **Bykov R.**, Itani T., Pletenchuk D., Ohlopkova O., Moshkin A., Stepanyuk M., Semenov A. // Viruses. – 2025. – Vol. 17. – Art. No. 1243 (15 p.) <https://doi.org/10.3390/v17091243> (Q1).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра
НВИ – норовирусная инфекция человека
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
РФ – Российская Федерация
УрФО – Уральский федеральный округ
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 групп крови человека)
NGS – Next Generation Sequencing (секвенирование следующего поколения)
ORF – Open Reading Frame (открытая рамка считывания)
RdRp – RNA-dependent RNA polymerase (РНК-зависимая РНК-полимераза)
SNP – Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
VP1 – major viral protein 1 (основной капсидный белок)

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук Семенову Александру Владимировичу. Сердечно благодарен Вам за ту искру интереса, которая благодаря Вашему увлеченному преподаванию разгорелась в настоящую любовь к науке. Также выражаю благодарность за преемственность научной традиции, и за ту атмосферу доверия и вдохновения, что позволяла двигаться вперед. Спасибо Вам за терпение и мудрость, которые стали путеводной звездой в этом исследовании. Для меня большая честь иметь возможность учиться у Вас.

Отдельные слова глубочайшей признательности автор адресует заведующему лабораторией энтеральных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, кандидату биологических наук Итани Тареку Мохамедовичу. Бесконечно признателен за всеобъемлющую поддержку и мудрое наставничество на каждом этапе этого научного пути. Спасибо за Ваш непререкаемый профессионализм и щедрую передачу многолетнего, аккумулированного Вами опыта в области микробиологии и вирусологии. Ваш пример стал одной из важнейших основ в формировании моего представления об образе настоящего ученого.