

УДК: 614.4

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОРОВИРУСОВ И АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИОННЫХ СОБЫТИЙ РЕГИОНА D

Плетенчук Дарья Ильинична^{1,2}, Быков Роман Олегович¹, Итани Тарек Мохамедович¹, Семенов Александр Владимирович^{1,2,3}

¹ФБУН ФНИИВИ "Виром" Роспотребнадзора

²Кафедра экспериментальной биологии и биотехнологий

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

³ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Норовирус человека (HuNoV) – высококонтагиозный возбудитель острого инфекционного гастроэнтерита. По данным на 2023 год в России показатель превалентности в структуре заболеваемости острым инфекционного гастроэнтерита вирусной этиологии составил 34,51 случаев на 100 тысяч населения. Регион D белка VP1, содержащий домены P1 и P2, определяет адаптивный иммунный ответ, а исследование его особенностей позволяет прогнозировать появление новых эпидемических вариантов норовирусов. **Цель исследования** – провести генетический анализ возбудителей НВИ на территории Свердловской области за 2024 г., а также эволюционный анализ нуклеотидных последовательностей региона D у норовирусных изолятов.

Материал и методы. Биологические образцы нативного фекального материала из разных муниципалитетов Свердловской области анализировались при помощи полимеразной цепной реакции и дальнейшего филогенетического анализа. **Результаты.** Из 384 исследованных образцов норовируса удалось типировать 216 изолятов, среди которых доминировала геногруппа GII (91,7%), представленная преимущественно генотипами GII.4 (41%) и GII.7 (38%). Филогенетический анализ выявил два основных кластера, соответствующих генотипам GII.7 и GII.6, с выраженной гетерогенностью изолятов GII.7 и полифилетическими связями между российскими и зарубежными последовательностями. При оценке генетической дистанции обнаружена высокая степень дивергентной эволюции генотипа GII.7 (7% дивергенции) и значительная дистанция (14%) между генотипами GII.6 из Свердловской области и Нижнего Новгорода. **Выводы.** В Свердловской области доминируют генотипы GII.4 и GII.7. Высокая генетическая дистанция последовательностей региона D указывает на однонаправленную дивергентную эволюцию. Продолжение исследований генетического разнообразия региона D норовирусов актуально для эпидемиологического надзора из-за отсутствия перекрестного иммунитета к новым вариантам.

Ключевые слова: норовирус, норовирусная инфекция, регион D, филогенетический анализ.

GENETIC CHARACTERISTICS AND EVOLUTIONARY EVENTS IN THE D REGION OF NOROVIRUSES.

Pletenchuk Daria Ilinichna^{1,2}, Bykov Roman Olegovich¹, Itani Tarek Mohamedovich¹, Semenov Aleksandr Vladimirovich^{1,2,3}

¹Federal Scientific Research Institute of Viral Infections “Virome”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

²Department of Experimental Biology and Biotechnology

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin»

³Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Human norovirus (HuNoV) stands out as a highly contagious pathogen that causes acute infectious gastroenteritis. In Russia, the prevalence rate for viral gastroenteritis cases reached 34.51 occurrences per 100,000 population. Region D of the VP1 protein contains the P1 and P2 domains, crucial for the adaptive immune response and enabling the prediction of new epidemic norovirus variants. **The aim of the study** is to carry out a genetic analysis of norovirus pathogens in Sverdlovsk region in 2024 and perform an evolutionary examination of nucleotide sequences within the D region from norovirus isolates. **Material and methods.** Biological samples comprised of native fecal material were collected from various municipalities' across the Sverdlovsk region, analyzed through polymerase chain reaction followed by phylogenetic analysis. **Results.** Among the 384 norovirus samples analyzed, 216 isolates were successfully typed, with the GII genogroup dominating (91,7%). The most prevalent genotypes included GII.4 at 41% and GII.7 at 38%. Phylogenetic analysis revealed two main clusters corresponding to genotypes GII.7 and GII.6, with pronounced heterogeneity of GII.7 isolates and polyphyletic relationships between Russian and foreign sequences. When assessing genetic distance, we detected a high degree of divergent evolution for genotype GII.7 (7% divergence) and a significant distance (14%) between GII.6 genotypes from Sverdlovsk region and Nizhny Novgorod. **Conclusions.** We confirm that genotypes GII.4 and GII.7 dominate in the Sverdlovsk region. The high genetic distance of sequences from

the D region indicates unidirectional divergent evolution. Monitoring of the D region is important for epidemiological surveillance due to the lack of cross-immunity to new variants.

Keywords: norovirus, norovirus infection, D region, phylogenetic analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Норовирус человека (HuNoV) относится к группе высококонтагиозных энтеральных вирусных возбудителей острого инфекционного гастроэнтерита. Превалентность возбудителей норовирусной инфекции человека (НВИ) в структуре заболеваемости острого инфекционного гастроэнтерита вирусной этиологии в РФ на 2023 год составила 34,51 случаев на 100 тысяч населения, что выше 2022 г. на 15,12 % и среднееголетнего показателя (СМП) (17,39) в 2 раза. По итогам молекулярно-генетического мониторинга норовирусов в 2023 году Свердловская область включена в перечень субъектов с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией в отношении НВИ (135,37) [1].

Генотипический профиль норовирусов в Российской Федерации (РФ) в основном представлен такими распространенными геновариантами, как GII.4[P16], GII.7[P7], GII.3[P12], GII.17[P17]. В Свердловской области в 2022 г. значительную долю выявленных норовирусных генотипов составили норовирусы, относящиеся к GI.3 (17/76, 22%), GII.17 (32/76, 42%), GII.4 (7/76, 9%). За 2023 г. генотипический профиль представлен GII.4 (58/120, 48%) и GII.17 (33/120, 28%) [2].

Морфология и ультраструктура норовирусного вириона представляет собой сферическую форму вирусной частицы диаметром около 38 нм, образованную димерами капсидных белков VP1 и VP2. Вирусный геном характеризуется монопартичностью за счет наличия линейной несегментированной одноцепочечной РНК положительной полярности, где 5'-конец генома ковалентно соединен с белком VPg, который необходим для инициации факторов трансляции клеток хозяина, а 3'-конец полиаденилирован (Poly-AAA хвост) [3, 4].

Определенные домены главного капсидного белка VP1 выполняют структурную (форменную) функцию, другие домены образуют дугообразные концевые выступы, играющие важную роль во взаимодействии вириона с кофакторами связывания, а также в иммунной реактивности макроорганизма. Так, например, регион D в VP1 содержит домены P1, P2, особенности которых определяют формирование адаптивной иммунной реакции в организме человека, что обуславливает специфичность взаимодействия геноварианта => иммунный ответ. Мониторинг развития во времени эволюционных событий внутри региона D позволит своевременно отслеживать возникновение новых эпидемических вариантов норовирусов (эмерджентных норовирусов) в человеческой популяции с целью прогнозирования потенциальных вспышек спорадической/групповой заболеваемости [5, 6].

Цель исследования – провести генетический анализ возбудителей НВИ на территории Свердловской области за 2024 г., провести эволюционный анализ нуклеотидных последовательностей региона D у норовирусных изолятов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании проанализированы образцы нативного фекального материала от пациентов с НВИ из различных муниципалитетов Свердловской области (Екатеринбург, Каменск-Уральский, Сухой Лог, Невьянск, Бисерть, Серов, Нижний Тагил и Краснотурьинск).

Выделение нуклеиновых кислот проводили методом переосаждения с использованием набора «РИБО-преп» (Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва). Синтез кДНК осуществляли путем обратной транскрипции с применением набора «РЕВЕРТА-Л» (Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва).

Для амплификации регионов, кодирующих VP1/РНК-полимеразу (N. Navarro-Lleó) и регион D норовирусного генома (J. Vinjé), использовали два протокола ПЦР с вырожденными праймерами. Амплификацию проводили с помощью набора 5x ScreenMix (Евроген, г. Москва). Продукты ПЦР имели размеры 500 п.н. и 253 п.н. Определение нуклеотидных последовательностей проводили при использовании метода секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием сервиса BLAST (National Center for Biotechnology Information URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [Дата обращения: 25.02.25]) [7]. Построение аддитивных филограмм осуществляли методом ближайшего соседа (Neighbor–Joining) с использованием эволюционной модели Kimura– 2. Достоверность топологии оценивали методом Bootstrap–анализа (1000 псевдореplikаций). Генетическую дистанцию определяли методом p– distance matrix на основе различий в аминокислотных последовательностях. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора (рег. № НИР 123051100045– 0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

За 2024 год проанализировано 384 образца клинического материала. По результатам секвенирования региона VP1/РНК– полимеразы удалось типировать 216 изолятов (52,25% от количества всех исследованных образцов). Доминирующей геногруппой являлась GII (198/216, 91,7%). Также были идентифицированы редкие генотипы, относящиеся к геногруппе GI (17/216, 7,9%) и GIV (1/216, 0,4%). В 2024 г. большая доля выявленных норовирусных генотипов представлена GII.4 (88/216, 41%), GII.7 (82/216, 38%), GII.17 (14/216, 6%), GII.3 (9/216, 4%) GI.2 (8/216, 4%).

При апробации протокола амплификации нуклеотидных последовательностей региона D капсидного белка VP1 был проведен гель– электрофорез с регистрацией фрагментов кДНК длиной 253 п.н. (Рис. 1). Идентификация нуклеотидных последовательностей региона D выполнена с помощью NCBI BLAST.

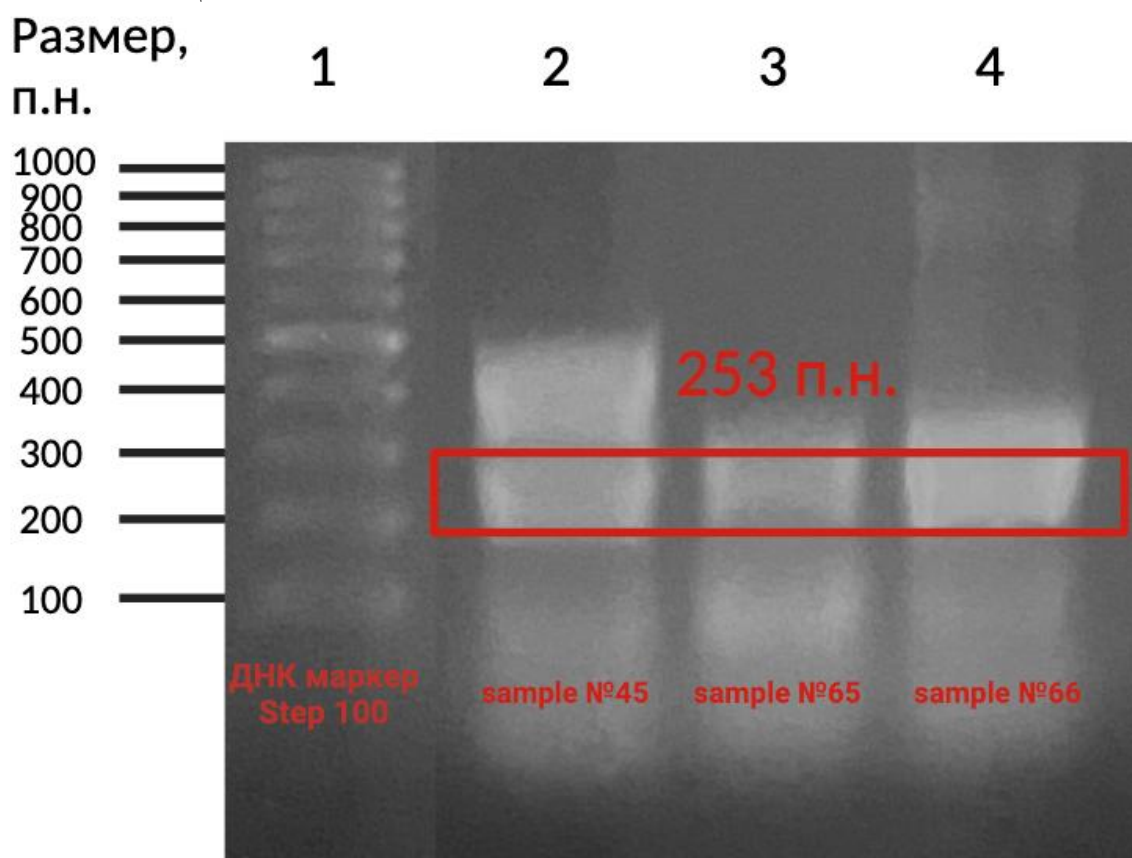


Рис. 1 «Фрагмент нуклеотидной последовательности кДНК региона D при проведении гель– электрофореза»

Реконструкция аддитивных филограмм демонстрирует формирование двух генетических кластеров, соответствующих генотипам GII.7 и GII.6 (Рис. 2). Изоляты GII.7 формируют пара– и полифилетические связи между смежными изолятами региона D внутри кластера, что обусловлено выраженной гетерогенностью выявленных геновариантов, также отмечается формирование полифилетических связей между группой зарубежных

нуклеотидных последовательностей GII.7. Геновариант GII.6/68/SVE/24 образует полифилетические связи между последовательностями из Нижнего Новгорода и Японии.

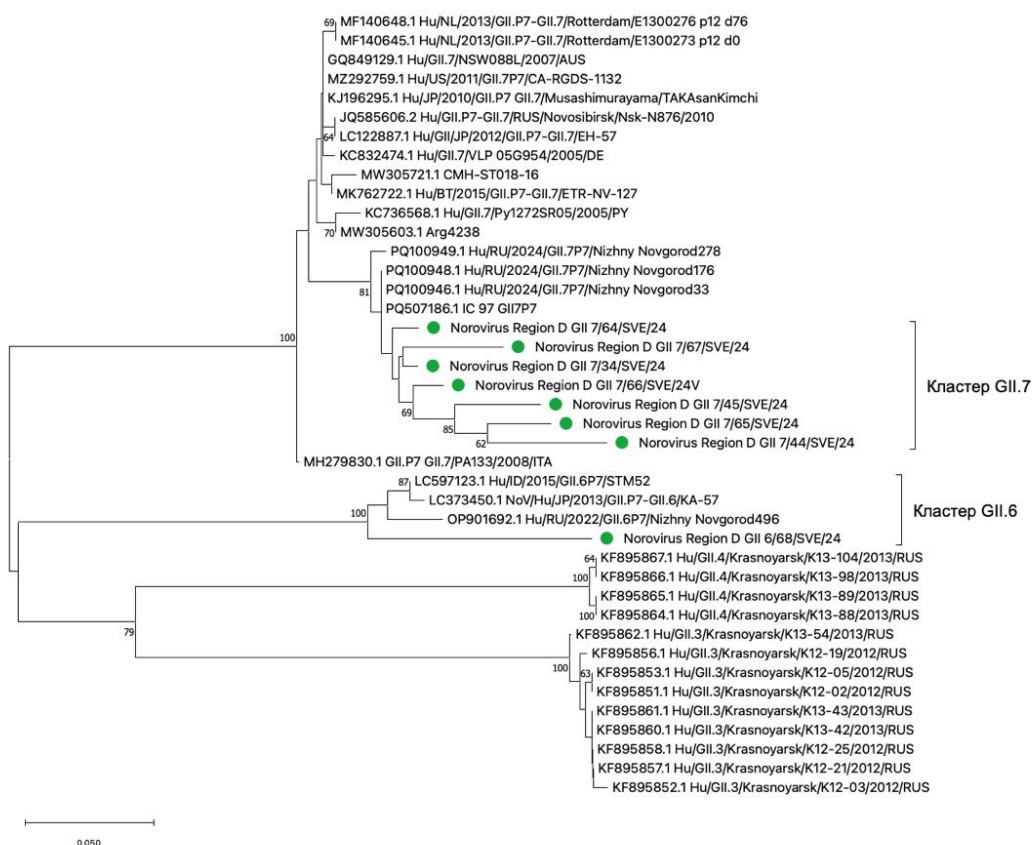


Рис. 2 «Реконструкция аддитивной филограммы, построенная на основе нуклеотидных последовательностей региона D норовирусных генотипов GII.6, GII.7»

Примечание: представлены зелеными кружками)

При построении матрицы генетической дистанции между аминокислотными последовательностями региона D генотипа GII.7 была определена высокая степень дивергентной эволюции, где средний процент дивергенции составил 7%. Генетическая дистанция аминокислот между генотипами GII.6 из Свердловской области и Нижнего Новгорода составила 14 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

За 2024 год в структуре генетических групп норовируса наибольший удельный вес приходится на геногруппу GII (91,7%), что согласуется с данными за прошлый анализируемый период 2022–2023 гг. Также был идентифицирован редкий генотип GIV.1, относящийся к геногруппе GIV [2].

В 2024 году регистрируется тенденция к смене циркуляции норовирусных генотипов по сравнению с периодом 2022–2023 гг. Генотип GII.7 вытеснил генотип GII.17, удельный вес которого последовательно снижался с 42% (от общего числа исследованных образцов) в 2022 году до 28% в 2023 году [2].

Результаты филогенетического анализа региона D демонстрируют выраженную гетерогенность нуклеотидных последовательностей изолятов GII.7, выявленных на территории Свердловской области, а также изолятов GII.6 при сравнении с генотипами из Нижнего Новгорода и Японии. Формированию пара– полифилетических связей сопутствует влияние эволюционных факторов, обусловленных несинонимичными заменами в цепи норовирусного полипротеина, что подчеркивает необходимость регулярного мониторинга региона D генома норовируса. Эволюционные механизмы, происходящие в регионе D, определяют специфику взаимодействия между норовирусным вирионом и клеткой– мишенью, а значительная генетическая дистанция может являться следствием появления новых вариантов капсидного белка VP1.

ВЫВОДЫ

1. Наибольший удельный вес в генотипическом составе норовирусов приходится на генотипы GII.4 и GII.7;
2. Формирование высокого процента генетической дистанции между последовательностями региона D из Свердловской области свидетельствует об однонаправленном действии движущих сил дивергентной эволюции;
3. Мониторинг эволюционных изменений региона D является важным этапом в построении эпидемиологического надзора за вспышками групповой/спорадической заболеваемости норовирусного гастроэнтерита по причине отсутствия перекрестной иммунной реакции в ответ на пенетрацию нового паттерна региона D в VP1.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. О состоянии санитарно– эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, – 2024. – 364 с.
2. 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. – No 16(7). – C. 1000.
3. Thorne, L.G. Norovirus gene expression and replication / L.G. Thorne, I.G. Goodfellow // Journal of general virology. – 2014. – No 95(2). – C. 278–291.
4. 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 Pathog. – 2016. – No 12(1).
5. X– ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid / B.V. Prasad, M.E. Hardy, T. Dokland [et al.] // Science. – 1999. – No 286. – C. 287–90.
6. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus / S. Cao, Z. Lou, M. Tan [et al.] // J Virol. – 2007. – No 81(11). – C. 5949–57.
7. National Center for Biotechnology Information. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 25.02.2025). – Текст: электронный.

Сведения об авторах

Д.И. Плетенчук* – студент магистратуры
Р.О. Быков – младший научный сотрудник
Т.М. Итани – кандидат биологических наук
А.В. Семенов – доктор биологических наук, профессор

Information about the authors

D.I. Pletenchuk* – M.S. student
R.O. Bykov – Researcher
T.M. Itani – Candidate of Sciences (Biology)
A.V. Semenov – Doctor of Sciences (Biology), Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

pletenchuk_di@niivirom.ru

УДК: 616– 053.02

КОРРЕЛИРУЕТ ЛИ УРОВЕНЬ ХОЛЕСТЕРИНА И БЕЛКА, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ С ВОЗРАСТОМ?

Семерикова Екатерина Андреевна, Копенкин Максим Александрович, Базарный Владимир Викторович

Центральная научно– исследовательская лаборатория

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Старение населения вызывает необходимость разработки персонализированных подходов к лечению пожилых с учетом биологического возраста, оцениваемого с помощью биомаркеров. Ротовая жидкость (РЖ) представляет собой перспективный, неинвазивный источник таких биомаркеров. В контексте возрастных изменений сердечно– сосудистой системы (ССС), уровни холестерина (ХС) и белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), в РЖ могут отражать процессы старения и представлять интерес для разработки стратегий здорового долголетия. **Цель исследования** – исследовать возможность использования слюварного ХС и БСЖК в оценке старения. **Материал и методы.** У 15 человек (9 зрелых, 6 пожилых) определяли индекс КПУ, РМА, УИГ и анализировали уровни ХС (ферментативный метод – CHOD– PAP), БСЖК (метод твердофазного ИФА) и общего белка (спектрофотометрия с помощью пирогаллового красного (ПГК)). Статистический анализ: критерий Манна– Уитни, корреляция Спирмена (Python/SciPy, $p < 0,05$). **Результаты.** Стандартизованное содержание