

*Н. В. Полякова, Е. О. Самойлович, Г. В. Семейко*

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОТАВИРУСОВ РЕДКО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ ГЕНОТИПОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»*

*При проведении молекулярно-генетического мониторинга циркуляции ротавирусов в Республике Беларусь в 2012–2015 гг. наряду с широко распространенными генотипами были выявлены три редких для Беларуси генотипа (G12P[8], G3P[9], G2P[8]), из которых два последних являются редкими во всем мире.*

*Секвенирование VP7 и VP4 генов данных вирусов и их филогенетический анализ показал, что белорусские ротавирусы G3P[9] имеют зоонозное происхождение, ротавирусы G12P[8] и один из штаммов G2P[8] – завозное. Для двух штаммов G2P[8] установлен эпизод реассортации завозного ротавируса с индигенными штаммами. Полученные данные свидетельствуют о высокой изменчивости ротавирусов и подтверждают необходимость проведения мониторинга их циркуляции.*

**Ключевые слова:** ротавирусы, филогенетический анализ, G2P[8], G3P[9], G12P[8].

***N. V. Polyakova, E. O. Samoylovich, G. V. Semeyko***

## THE PHYLOGENETIC CHARACTERISTIC OF ROTAVIRUSES OF SELDOM FOUND GENOTYPES REVEALED IN REPUBLIC OF BELARUS

*Molecular monitoring of rotavirus circulation in Belarus in 2012–2015 reveals three rare for Belarus genotypes (G12P[8], G3P[9], G2P[8]), last two of which are rare worldwide.*

*Sequencing of VP4 and VP7 genes of these viruses and their phylogenetic analysis shows that rotaviruses G3P[9] have zoonotic origin, rotaviruses G12P[8] and one of the strains G2P[8] have imported origin.*

*For two strains of G2P[8] establish an episode of reassortment with native strains. Our observations provide important insights into the evolutionary dynamics of rotavirus and confirm the importance of their monitoring.*

**Keywords:** rotaviruses, phylogenetic analysis, G2P[8], G3P[9], G12P[8].

Ротавирус – мелкий РНК-содержащий вирус рода Rotavirus семейства Reoviridae. Геном вируса состоит из одиннадцати сегментов двуцепочечной РНК и кодирует

6 структурных (VP1–VP4, VP6, VP7) и 6 неструктурных (NSP1–NSP6) белков [5]. При характеристике ротавируса используется бинарная система, включающая информацию о G-генотипе, который кодируется геном VP7, и [P]-генотипе, который кодируется участком гена VP4. К настоящему времени выявлено 27 G-генотипа и 37 [P]-генотипов ротавирусов. Теоретически число возможных G[P] комбинаций составляет  $10^{11}$ , однако исследователями было выявлено не более 80 G[P] комбинаций, циркулирующих в популяции людей и животных [10].

Как правило, комбинация двух генов VP7 и VP4, кодирующих белки внешней оболочки и определяющих генотип ротавируса, имеет устойчивые сочетания и приводит к образованию типичных генетических вариантов, циркулирующих в мире. В соответствии с разработанной Matthijnsens и коллегами (2008 г.) классификацией ротавирусов, учитывающей характеристики всех 11 генов, все штаммы были разделены на три геногруппы: наиболее распространенные – Wa, достаточно распространенные – DS-1, менее распространенные – AU-1 [11]. Согласно данной классификации каждому из 11 генов присваивается буквенный код: G (VP7), P (VP4), I (VP6),

R (VP1), C (VP2), M (VP3), A (NSP1), N (NSP2), T (NSP3), E (NSP4) и H (NSP5). Wa-подобные штаммы имеют «созвездие генов» I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, которое сочетается с геном VP7, кодирующим генотипы G1, G3, G4, G9, G12 и геном VP4, кодирующим генотипы P[8] и P[6]. В результате сильных детерминант, позволяющих генам одной геногруппы наследоваться совместно, комбинации генов VP7 и VP4 происходят преимущественно внутри одной геногруппы и образуют типичные сочетания G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[6] и G12P[8], циркулирующие среди людей. DS-1-подобные штаммы имеют отличные от Wa-подобных штаммов гены I2-R2-C2-M2-A2-H2-T2-E2-H2, а гены VP7 и VP4 кодируют генотипы G2 и P[4], соответственно, образуя комбинацию G2P[4]. Существенно реже, чем Wa и DS-1 ротавирусы, встречаются ротавирусы геногруппы AU-1, к которой относится генотип G3P[9] в сочетании с генами I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3. Данная классификация является наиболее информативной и позволяет устанавливать эпизоды реассортации, как между различными геногруппами, так и между штаммами ротавирусов человека и животных.

Целью настоящего исследования было охарактеризовать редко встречающиеся генотипы ротавирусов, выявленные в Республике Беларусь при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции в 2012–2015 гг.

**Материалы и методы.** Изучена молекулярно-генетическая структура 505 ротавирусов: 368, выявленных в 2012–2015 гг. в г. Минске, и 137, выявленных в эпидемический сезон 2014 г. в областях Республики Беларусь: Брестской – 30, Витебской – 16, Гомельской – 30, Гродненской – 21, Могилевской – 40.

Диагностика ротавирусной инфекции основывалась на обнаружении антигена ротавируса с использованием иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ микробиологии и эпидемиологии.

Выделение вирусной РНК проводили из 10 %-й суспензии проб стула, содержащих антиген ротавируса, с помощью автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с наборами 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) согласно инструкции производителя.

Для определения генотипа ротавируса применяли мультиплексную полугнездовую ОТ-ПЦР [3, 6, 7]. Генотипирование ротавирусов проводили по двум генам: девятому, кодирующему белок VP7 (G-генотип), и четвертому, кодирующему белок VP4 (P-генотип).

В целях более детальной молекулярно-генетической характеристики редко встречающихся штаммов выполнено секвенирование девятого гена (VP7) и четвертого гена (VP4) трех штаммов генотипа G2P[8], двух штаммов генотипа G3P[9] и трех штаммов генотипа G12P[8] на капиллярном секвенаторе (3100 Avant, Applied Biosystems, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0.

Филогенетический анализ выявленных в Республике Беларусь редко встречающихся генотипов ротавирусов осуществляли с использованием алгоритма neighbor-joining посредством программы MEGA6 [12, 14]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

**Результаты и обсуждение.** По результатам мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР установлено, что генетическая структура ротавирусов, циркулировавших в течение 2012–2015 гг. в г. Минске и в эпидемический сезон 2014 г. в областях Республики Беларусь, была представлена восьмью генотипами: G4P[8] (58,2 %), G1P[8] (20,0 %), G3P[8] (7,1 %), G2P[4] (6,7 %), G9P[8] (6,1 %), G12P[8] (0,6 %), G2P[8] (0,6 %) и G3P[9] (0,4 %). Большинство (99,0 %) из идентифицированных генотипов относятся как к широко распространенным в Республике Беларусь, регистрируясь практически ежегодно, так и в мире [1–4, 13]. Среди выявленных ротавирусов были обнаружены три генотипа (G12P[8], G3P[9], G2P[8]), которые редко встречаются в Республике Беларусь, а два последних относятся и к редко встречающимся в мире.

**Ротавирусы генотипа G2P[8].** Ротавирусы генотипа G2P[8] были выявлены у трех детей с ОГЭ, госпитализированных в Витебскую областную клиническую инфекционную больницу в марте 2014 г.

Согласно современной классификации уникальность генотипа G2P[8] заключается в том, что он является межгрупповым реассортантом. Ген, кодирующий белок VP7, принадлежит к геногруппе DS-1, а ген, кодирующий белок VP4 – к геногруппе Wa, что делает данную комбинацию достаточно редкой [8].

Поиск ротавирусов с аналогичным генотипом в Международной базе данных GenBank показал, что ротавирусы G2P[8] также были выделены в ЮАР – в 2005 г., Индии – в 2010 г., России – в 2011 г., Корее – в 2011 г., Эквадоре – в 2011 г. и Таиланде – в 2013 г.

Выполненное секвенирование трех белорусских штаммов генотипа G2P[8] (RVA-8765, RVA-8767, RVA-8769) показало,

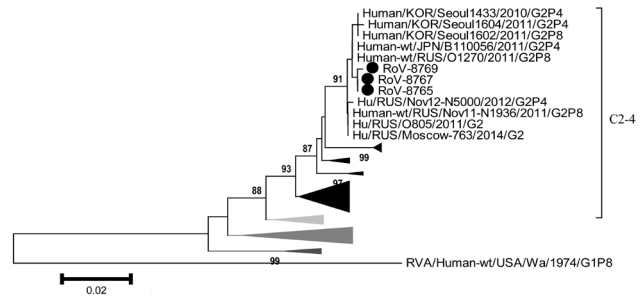


Рисунок 1. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP7 (640 п. н.) трех ротавирусов G2P[8], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), и ротавирусов генотипов G2P[8] и G2P[4] из разных стран мира с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >70 %

что по гену VP7 они имеют высокий уровень гомологии по отношению друг к другу (99,8 %), уровень их гомологии по гену VP4 – существенно более низкий (96,6–97,0 %).

Сравнение белорусских штаммов со штаммами представленными в GenBank свидетельствует об их близком родстве (98,9–99,4 %) по гену VP7 с ротавирусами G2P[8] из России, Кореи (2011 г.), а также ротавирусами G2P[4] из России (2014 г.), Кореи (2010–2011 г.) и Японии (2010 г.). Выделенные в Витебске ротавирусы G2P[8], как и большинство ротавирусов циркулирующих в настоящее время, принадлежат к подгруппе G2-4 (рисунок 1).

По гену VP4 все три штамма G2P[8] относились к широко распространенной подгруппе P[8]-3, объединяющей современные вирусы из многих регионов мира. Несмотря на их высокую степень гомологии между собой по гену VP7, по гену VP4 они кластеризовались отдельно. Штамм RVA-8765 имел близкую степень родства (99,0–100,0 %) с ротавирусами, циркулировавшими в Азии в 2010–2014 гг. (Таиланд и Япония). Штамм RVA-8767 формировал кластер с ротавирусами из Азии (Индия, Вьетнам) и Европы (Италия), и в сравнении со штаммом RVA-8765 имел существенно более высокий уровень гомологии с ранее циркулировавшими белорусскими штаммами (84,5–85,6 % и 93,2–94,7 %, соответственно). Штамм RVA-8769 кластеризовался со штаммами из Беларуси и России. Уровень его гомологии по отношению к белорусским ротавирусам составлял 98,9–99,2 %, что позволяет отнести данный вирус по гену VP4 к индигенным штаммам (рисунок 2). По-



Рисунок 2. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP4 (748 п. н.) трех ротавирусов G2P[8], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), ротавирусов генотипов G2P[8] из разных стран мира, а также ротавирусов генотипа P[8] в сочетании с G1, G3, G4, G8, G9, G12 использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

лученные данные свидетельствуют о завозном характере одного из штаммов генотипа G2P[8] на территорию Республики Беларусь и имевшей место его последующей реассортации с индигенными штаммами.

Ротавирусы генотипа G3P[9]. В настоящее время ротавирусы G3P[9] относятся к редким в мире, их доля в генетической структуре ротавирусов не превышает 0,01 % [8]. Согласно данным литературы ротавирусы с генотипом G3P[9] циркулируют как среди людей, так и среди животных (в частности кошек и собак). Филогенетический анализ ряда их генов указывает на близкое родство ротавирусов G3P[9], изолированных от людей и животных, и позволяет предполагать, что среди людей они прямо или косвенно (через реассортации) распространились от животных [9].

Ротавирусы генотипа G3P[9] были выявлены у ребенка, госпитализированного в апреле 2013 г. в ДГКИБ г. Минска (RVA-7072), и у ребенка, госпитализированного в январе 2014 г. в Могилевскую областную больницу (RVA-10333).

Несмотря на то, что ротавирусы G3P[9] были выделены в разных регионах страны с интервалом в год, проведенное секвенирование показало их высокую степень гомологии между собой как по гену VP7 (99,6 %), так и по гену VP4 (100,0 %). Сравнение нуклеотидных последовательностей белорусских штаммов со штаммами, представленными в базе данных Gen Bank, показало, что по гену VP7 они близкородственны ротавирусам G3P[9] из России (98,2–99,1 %), и относятся

к подгруппе G3-1, по гену VP4 – ротавирусам G3P[9] из Франции, Кореи, России, ротавирусам G6P[9] из Венгрии (97,3–98,9 %) и относятся к подгруппе P[9]-с. По обоим генам белорусские штаммы G3P[9] также являются близкородственными (98,9 %) вирусу, изолированному от кошки, что подтверждает данные литературы о том, что ротавирусы G3P[9] могут иметь зоонозное происхождение (рисунки 3 и 4).

Ротавирусы генотипа G12P[8]. Несмотря на достаточно широкую распространенность генотипа G12P[8] в Европе, в Республике Беларусь вирус (RVA-9331) этого генотипа был обнаружен впервые в 2014 г. В 2015 г. ротавирусы генотипа G12P[8] были выявлены в пробах стула еще двух детей (RVA-10163 и RVA-10279). В этом же году в одной из проб стула была обнаружена смесь G12+9P[8]. Все ротавирусы генотипа G12P[8] были выявлены у детей в г. Минске.

Секвенирование выявленных в Республике Беларусь ротавирусов генотипа G12P[8] показало, что они обладают близким родством по отношению друг к другу как по гену VP7 (99,8 %), так и по гену VP4 (99,8 %). Сравнение нуклеотидных последовательностей белорусских штаммов со штаммами, представленными в базе данных Gen Bank, показало, что по гену VP7 они принадлежат к наиболее распространенной в настоящее время подгруппе G12-3 и являются близкородственными ротавирусам G12P[8] из Италии, Франции и США (98,2–99,8 %), по гену VP4 относятся к подгруппе P[8]-3

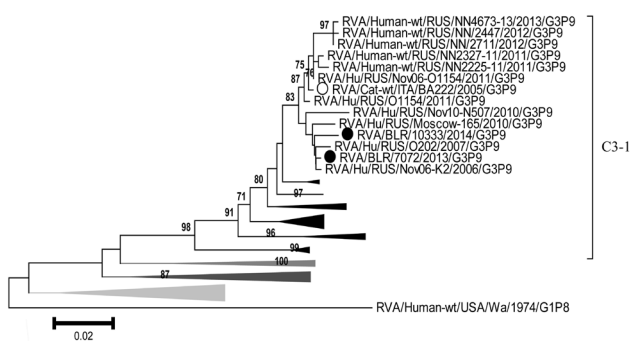


Рисунок 3. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP7 (692 пар нуклеотидов) двух ротавирусов G3P[9], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), и ротавирусов генотипов G3P[9], выделенных от людей и животных, методом neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

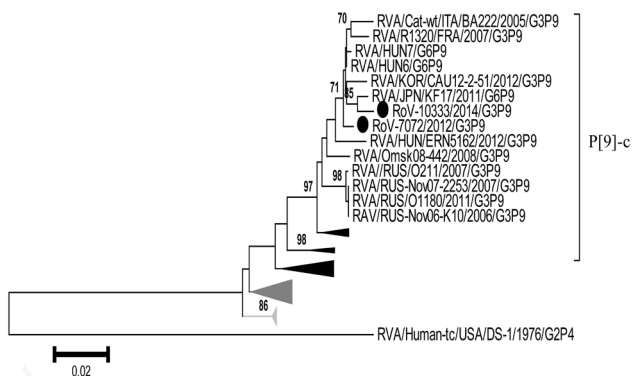


Рисунок 4. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP4 (776 п. н.) двух ротавирусов G3P[9], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), и ротавирусов P[9] в сочетании с G3 и G6, выделенных от людей и животных, с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

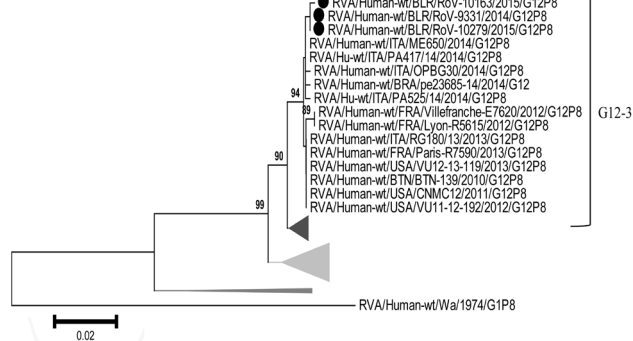


Рисунок 5. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP7 (730 п.н.) трех ротавирусов G12P[8], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), и ротавирусов генотипов G12 в сочетании с P[8], P[6] и P[9], выделенных в различных странах, с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

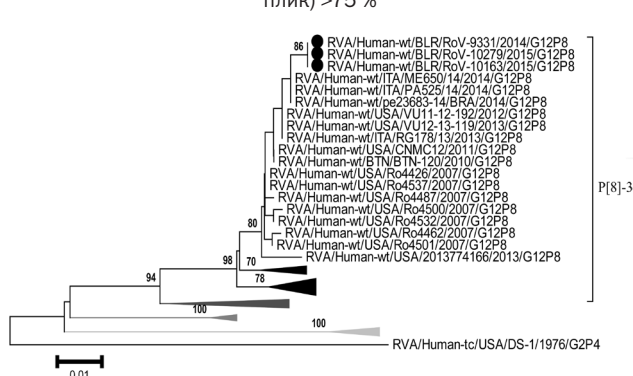


Рисунок 6. Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP4 (618 п. н.) трех ротавирусов G12P[8], выявленных в Республике Беларусь (обозначены ●), и ротавирусов G12P[8] из других стран, с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

## □ Оригинальные научные публикации

и филогенетически близки ротавирусам из Италии и США (98,2–99,8 %) (рисунки 5 и 6).

Близкое родство белорусских штаммов G12P[8] с ротавирусами из других стран, где данный генотип относится к широко распространенным [4], позволяет предполагать завозной характер генотипа G12P[8] на территорию Республики Беларусь.

Таким образом, при проведении молекулярно-генетического мониторинга циркуляции ротавирусов в Республике Беларусь в 2012–2015 гг. наряду с широко распространенными генотипами были выявлены три редких для Беларуси генотипа (G12P[8], G3P[9], G2P[8]), из которых два последних являются редкими во всем мире. Филогенетический анализ генов VP7 и VP4 данных вирусов позволил установить зоонозное происхождение ротавирусов G3P[9], завозной характер ротавирусов G12P[8] и одного из ротавирусов G2P[8], выявить эпизод реассортации завозных штаммов с индигенными. Полученные данные подтверждают необходимость проведения молекулярно-генетического мониторинга циркуляции ротавирусов, который позволит выявить не только редкие генотипы ротавирусов, но и определить их происхождение и возможность последующего распространения.

### Литература

1. Гудков, В. Г., Вирина А. С., Плотнокова К. Ю., Бискина Н. М., Новацкая Ю. В. Ротавирусная инфекция в Республике Беларусь: характеристика эпидемического процесса, оценка бремени заболеваемости и структура GP популяции возбудителя. // *Здравоохранение (Минск)*. – 2010. – № 11. – С. 28–33.
2. Полякова, Н. В., Семейко Г. В., Самойлович Е. О. Генотипический пейзаж ротавирусов – этиологических агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012–2013 гг. // *Сб. научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика»*. – 2014. – Т. 7. – С. 19–27.
3. Das, B. K., Gentsch J. R., Cicirello H. G., Woods P. A., Gupta A. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India // *Journal of clinical microbiology*. – 1994. – Т. 32, № 7. – С. 1820–1822.
4. Dóro, R., László B., Martella C. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Т. 28. – С. 446–461.

5. Estes, M. K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function // *Microbiological reviews*. – 1989. – Т. 53, № 4. – С. 410–449.
6. Gentsch, J., Glass R. I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1992. – Т. 30, № 6. – С. 1365–1373.
7. Gouvea, V., Glass R. I., Woods P., Taniguchi K., Clark H. F. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens // *Journal of clinical microbiology*. – 1990. – Т. 28, № 2. – С. 276–282.
8. Komoto, S., Tacharoenuang, R., Guntapong, R., Ide, T., Haga, K., Katayama, K. Emergence and characterization of unusual DS-1-like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand // *PLoS one*. – 2015. – Т. 10, № 11. – С. 14–39.
9. Martella, V., Potgieter A. C., Lorusso E., De Grazia S., Giammanco, G. M., Matthijnssens, J. A feline rotavirus G3P [9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P [9] rotaviruses // *Journal of general virology*. – 2011. – Т. 92, № 5. – С. 1214–1221.
10. Matthijnssens, J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S. M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains // *Journal of virology*. – 2008. – Т. 82, № 7. – С. 3204–3219.
11. Matthijnssens, J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M. K. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments // *Archives of virology*. – 2008. – Т. 153, № 8. – С. 1621–1629.
12. Saitou, N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular biology and evolution*. – 1987. – Т. 4, № 4. – С. 406–425.
13. Semeiko, G. V., Yermalovich M., Polyakova N., Mijatovic-Rustempasic S., Kerin T., Wasley A., Videbaek D., Gentsch J., Bowen M., Samoilovich E. Rotavirus genotypes in Belarus, 2008–2012 // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Т. 28. – С. 480–485.
14. Tamura, K. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – Т. 30, № 12. – С. 2725–2729.
15. Yamamoto, S. P., Kaida A., Kubo H., Iritani, N. Gastroenteritis Outbreaks Caused by a DS-1-like G1P [8] Rotavirus Strain, Japan, 2012–2013 // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – Т. 20, № 6. – С. 1030.