

Характеристика полногеномной последовательности рекомбинантного норовируса генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012, выявленного в России

Е.В. Жираковская¹, А.Ю. Тикун¹, С.Н. Соколов^{1,2}, Б.И. Кравчук¹, Е.И. Краснова³, Н.В. Тикун¹ ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Аннотация. Норовирусы (сем. *Caliciviridae*) считаются частой причиной острого гастроэнтерита у людей всех возрастов. Эти небольшие безоболочечные вирусы с одноцепочечным (+)РНК-геномом характеризуются высокой генетической вариабельностью. По всему миру наблюдается постоянное изменение генетического разнообразия циркулирующих норовирусов и появление новых рекомбинантных вариантов. Недавно опубликованы данные о распространении рекомбинантных штаммов норовируса, в которых новая полимеразы генотипа GII.P16 сочеталась с капсидными белками VP1 разных генотипов. В рамках мониторинга спорадических случаев острых гастроэнтеритов в Новосибирске в 2016 г. было протестировано 46 клинических образцов от детей с диареей. Методом ОТ-ПЦР норовирус детектирован в шести клинических образцах от госпитализированных детей. Выявленные норовирусы путем секвенирования региона перекрывания ORF1/ORF2 были классифицированы как рекомбинантные варианты GII.P21/GII.3, GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Появление нового рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 впервые зафиксировано в Новосибирске весной 2016 г. До этого исследования в базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномные последовательности российских штаммов норовируса генотипа GII.P16/GII.3. В настоящей работе была определена полная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980). Сравнение нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей показало высокую гомологию этого российского штамма со штаммами генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов мира. Сравнительный анализ показал, что уникальные замены произошли в последовательностях генов полимеразы генотипа GII.P16, N-терминального белка р48 и минорного капсидного белка VP2, при этом существенных изменений в гене основного капсидного белка VP1 не наблюдалось. Анализ функциональной значимости этих изменений позволил предположить, что широкое распространение штаммов с новой полимеразой GII.P16, возможно, связано как с несколькими аминокислотными заменами в активном центре полимеразы, так и со вставкой остатка глутаминовой кислоты или глицина в N-терминальном белке р48, который блокирует секреторный иммунитет эпителиальных клеток кишечника. Дальнейший мониторинг генотипов позволит оценить распространение рекомбинантных норовирусов с полимеразой GII.P16 на территории России. Ключевые слова: норовирус; полный геном; полимеразы; белок р48; капсидные белки; филогенетический анализ; острый гастроэнтерит; мониторинг генотипов.

Для цитирования: Жираковская Е.В., Тикун А.Ю., Соколов С.Н., Кравчук Б.И., Краснова Е.И., Тикун Н.В. Характеристика полногеномной последовательности рекомбинантного норовируса генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012, выявленного в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):69-79. DOI 10.18699/VJ20.597

Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia

E.V. Zhirakovskaia¹, A.Y. Tikunov¹, S.N. Sokolov^{1,2}, B.I. Kravchuk¹, E.I. Krasnova³, N.V. Tikunova¹ ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Department of Infectious Diseases, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Abstract. Noroviruses (the *Caliciviridae* family) are a common cause of acute gastroenteritis in all age groups. These small non-envelope viruses with a single-stranded (+)RNA genome are characterized by high genetic variability. Continuous changes in the genetic diversity of co-circulating noroviruses and the emergence of new recombinant variants are observed worldwide. Recently, new recombinant noroviruses with a novel GII.P16 polymerase associated with different capsid proteins VP1 were reported. As a part of the surveillance study of sporadic cases of acute gastroenteritis in Novosibirsk, a total of 46 clinical samples from children with diarrhea were screened in 2016. Norovirus was detected in six samples

from hospitalized children by RT-PCR. The identified noroviruses were classified as recombinant variants GII.P21/GII.3, GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, and GII.P16/GII.4_Sydney_2012 by sequencing of the ORF1/ORF2 junction. In Novosibirsk, the first appearance of the new recombinant genotype GII.P16/GII.4_Sydney_2012 was recorded in spring 2016. Before this study, only four complete genome sequences of the Russian GII.P16/GII.3 norovirus strains were available in the GenBank database. In this work, the complete genome sequence of the Russian strain Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980) was determined. A comparison of the nucleotide and the deduced amino acid sequences showed a high homology of the Russian strain with GII.P16/GII.4_Sydney_2012 strains from other parts of the world. A comparative analysis showed that several unique substitutions occurred in the GII.P16 polymerase, N-terminal p48 protein, and minor capsid protein VP2 genes, while no unique changes in the capsid VP1 gene were observed. A functional significance of these changes suggests that a wide distribution of the strains with the novel GII.P16 polymerase may be associated both with several amino acid substitutions in the polymerase active center and with the insertion of glutamic acid or glycine in an N-terminal p48 protein that blocks the secretory immunity of intestinal epithelial cells. Further monitoring of genotypes will allow determining the distribution of norovirus recombinants with the polymerase GII.P16 in Russia.

Key words: norovirus; complete genome; polymerase; protein p48; capsid proteins; phylogenetic analysis; acute gastroenteritis; monitoring of genotypes.

For citation: Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Y., Sokolov S.N., Kravchuk B.I., Krasnova E.I., Tikunova N.V. Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):69-79. DOI 10.18699/VJ20.597

Введение

Норовирусы (сем. *Caliciviridae*, род *Norovirus*) считаются одной из частых причин вспышек и спорадических случаев острых гастроэнтеритов (ОГЭ) у людей всех возрастов (Bartsch et al., 2016). Норовирусная инфекция может вызывать тяжелые формы болезни с неблагоприятным исходом у детей раннего возраста и пожилых людей, а также хроническую диарею продолжительностью от нескольких месяцев до нескольких лет у пациентов с иммунодефицитом, онкологией и после трансплантации органов (Brown et al., 2017; Woodward et al., 2017; Petrigiani et al., 2018). Низкая инфицирующая доза (~10–100 вирусных частиц) и высокая устойчивость в окружающей среде способствуют быстрому распространению норовирусов контактно-бытовым путем, через пищевые продукты и воду (Kirby et al., 2015; Towers et al., 2018). Метаанализ эпидемиологических данных из многих стран показал, что встречаемость норовирусной инфекции у пациентов с ОГЭ в 2008–2014 гг. составляла 17–20 % вне зависимости от возраста больных (Ahmed et al., 2014). Распространенность бессимптомной формы норовирусной инфекции варьирует от 4 до 18 % в различных регионах мира (Qi et al., 2018).

Полиаденилированный одноцепочечный (+)РНК-геном норовируса (~7.5 тыс. н.) содержит три перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF1–ORF3) (Green, 2013). ORF1 кодирует длинный полипротеин, который посттрансляционно расщепляется вирусной протеазой на шесть неструктурных белков, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). ORF2 и ORF3 кодируют основной (VP1) и минорный (VP2) белки капсида соответственно. Выявлено два механизма генетической изменчивости норовирусов: точечные мутации и рекомбинация (Bull, White, 2011). Рекомбинационные события в норовирусном геноме чаще всего происходят в регионе, который включает участок перекрывания 3'-конца ORF1 (RdRp) и 5'-конца ORF2 (VP1), поэтому в настоящее время принята двойная номенклатура норовирусов, обозначающая генотипы RdRp/VP1 (Kroneman et al., 2013).

Норовирусы проявляют значительное генетическое и антигенное разнообразие, и в настоящее время на основе

аминокислотной последовательности VP1 их разделяют на семь геногрупп GI–GVII, которые далее подразделяют на более чем сорок генотипов (Kroneman et al., 2013). Установлено, что заболевание у людей могут вызывать норовирусы трех геногрупп – GI, GII и GIV (Green, 2013; Parra et al., 2017). В самой распространенной геногруппе GII выделяют 31 генотип RdRp и 23 генотипа VP1, их комбинация обозначается как GII.Px/GII.x (Kroneman et al., 2013; Vinje, 2015; RIVM, <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>). Средняя продолжительность генотип-специфического иммунитета после норовирусной инфекции может варьировать от 4 до 8 лет (Simmons et al., 2013), однако из-за существования широкого спектра генетических вариантов последующее заражение другими антигенными вариантами или «иммунотипами» норовируса может происходить через более короткий период времени (Parra et al., 2017).

Начиная с 1990-х гг. преобладающим считался норовирус GII.4, несколько эпидемических вариантов GII.P4/GII.4 которого сменяли друг друга с периодичностью в 2–3 года в течение двух десятилетий (Eden et al., 2013; Hoa Tran et al., 2013). В 2012 г. появился новый рекомбинантный вариант норовируса GII.4, классифицированный как GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, который позже стал доминирующим штаммом во всем мире (van Beek et al., 2013). В последние годы в молекулярной эпидемиологии норовируса стали наблюдаться изменения. В зимний сезон 2014/2015 новый штамм GII.P17/GII.17, впервые зарегистрированный в Китае, быстро вытеснил вариант GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и распространился сначала в азиатских странах, а затем и в других регионах мира (de Graaf et al., 2015). Недавно появились сообщения из разных географических регионов о распространении новых рекомбинантных штаммов норовируса, в которых полимеразы генотипа GII.P16 связана с капсидным белком различных генотипов, включая вариант GII.4_Sydney_2012 (Barreira et al., 2017; Bidalot et al., 2017; Ruis et al., 2017; Han et al., 2018; Hata et al., 2018).

Многолетний мониторинг генетического разнообразия энтеропатогенных вирусов в Новосибирске показал, что норовирусы генотипа GII.P4/GII.4 были одной из частых

причин спорадических случаев ОГЭ в 2003–2012 гг., тогда как норовирусы с полимеразой GII.P16 встречались крайне редко (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). Весной 2016 г. нами зафиксировано появление в Новосибирске нового рекомбинантного варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012. До этого исследование в международной базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномные последовательности рекомбинантных норовирусов генотипа GII.P16/GII.3 из России (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). Цель настоящей работы – определение полной последовательности генома российского штамма нового генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 и сравнительный анализ с аналогичными штаммами из других регионов мира и с российскими изолятами 2005–2012 гг., в которых полимеразы генотипа GII.P16 находилась в сочетании с другими вариантами VP1.

Материалы и методы

Происхождение вирусных штаммов. В рамках мониторинга генетического разнообразия энтеропатогенных вирусов были собраны клинические образцы от детей с диареей, госпитализированных в Детскую городскую клиническую больницу № 3 и находившихся на амбулаторном лечении в 2016 г. От каждого родителя/опекуна ребенка получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, с соблюдением добровольности в соответствии с Федеральным законом РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Выявление и дифференциация РНК различных энтеропатогенных вирусов проведены методом ОТ-ПЦР с использованием верифицированной лабораторной панели праймеров, как описано ранее (Zhirakovskaia et al., 2019).

Секвенирование. Выявленные изоляты норовируса были охарактеризованы методом прямого секвенирования фрагмента генома (~1400 н.), включающего участок (20 н.) перекрытия ORF1/ORF2. Нуклеотидные последовательности определены методом Сэнгера с использованием BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Секвенирование полной нуклеотидной последовательности генома штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 выполнено primer-walking методом с использованием панели новых разработанных праймеров. Полученные данные проанализированы с помощью программы FinchTV (Geospiza, США). Секвенированные фрагменты генома были собраны в общую нуклеотидную последовательность в приложении SeqMan из пакета программы Lasergene Evolution Suite (DNASTAR, Мэдисон, США). Генотип норовируса был определен с помощью сервиса Norovirus Typing Tool v. 2.0 (RIVM; <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) (Kroneman et al., 2013).

Филогенетический анализ. Поиск гомологичных последовательностей проведен с использованием сервиса BLAST 2.9.0+ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей по алгоритму ClustalW и филогенетический анализ сделаны в программе MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/>). Филогенетические деревья построены методом Neighbor-Joining с использованием Kimura 2-parameter модели. Оценка

достоверности узлов выполнена с бутстреп-анализом 1000 псевдореплик данных; на филограммах приведены статистические индексы поддержки более 80 %. Степень идентичности нуклеотидной и аминокислотной последовательностей рассчитывалась в программе BioEdit v7.2.6 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Вариативность выведенных аминокислотных последовательностей полипротеина, включающего полимеразу генотипа GII.P16, а также капсидных белков VP1 и VP2 варианта GII.4_Sydney_2012, была определена с помощью приложения Sequence Data Explorer из программы MEGA 7.

Полученные в данном исследовании нуклеотидные последовательности были аннотированы и зарегистрированы в международной базе данных GenBank с номерами доступа KY210919, KY210976–KY210980, KY210983, MG892912 и MG892914.

Результаты

Методом ОТ-ПЦР было протестировано 46 образцов фекалий от детей в возрасте от 1 мес до 8 лет. Энтеропатогенные вирусы выявлены в 15 (32.6 %) образцах. Норовирусная инфекция диагностирована у шести госпитализированных детей в возрасте от 1 до 9 мес. Анализ нуклеотидных последовательностей (~1400 н.), включающих область перекрытия ORF1/ORF2, на ресурсах BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и RIVM (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) показал, что выявленные изоляты норовируса относились к трем рекомбинантным вариантам (табл. 1).

Нуклеотидные последовательности штаммов норовируса, наиболее гомологичные последовательностям, полученным в этом исследовании, были определены в результате поиска на сервисе BLAST. Изолят NS16-C32 генотипа GII.P21/GII.3 имел высокую степень гомологии со штаммами, циркулировавшими в Новосибирске (97.6–98.9 %) в 2010–2012 гг. (Zhirakovskaia et al., 2019) и в Европе (96.5–97.2 %) в 2014–2016 гг. (Brown et al., 2019). Два изолята, NS16-C12 и NS16-C13, генотипированные как GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, имели высокую степень гомологии (99.3–99.5 %) с последовательностями штаммов 2014–2016 гг. из Юго-Восточной Азии и Великобритании (Brown et al., 2019) и 96.9–97.1 % идентичности со штаммами, циркулировавшими в Новосибирске ранее (Zhirakovskaia et al., 2019). Нуклеотидные последовательности еще трех изолятов – NS16-C36, NS16-C37 и NS16-C38, принадлежащих к новому генотипу GII.P16/GII.4_Sydney_2012, имели 100 % идентичность между собой и 96.2 % гомологию с последовательностями изолятов NS16-C12 и NS16-C13. Генетическое сходство изолятов NS16-C36, NS16-C37 и NS16-C38 со штаммами GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов составило 97.4–98.9 % по нуклеотидной последовательности.

На основе полных последовательностей норовирусов, доступных в GenBank, было создано несколько наборов оригинальных праймеров для секвенирования полных последовательностей ORF1, RdRp, ORF2 и ORF3 различных генотипов. Для двух изолятов, NS16-C13 и NS16-C32, определены нуклеотидные последовательности (~4300 н.), включающие RdRp, ORF2 и ORF3, которые были зарегистрированы в базе данных GenBank как

Таблица 1. Эпидемиологические данные норовирус-положительных случаев острого гастроэнтерита в Новосибирске в 2016 г.

№	Изолят норовируса	Пациент		Генотип RdRp/VP1	GenBank ID
		Возраст, мес	Пол		
1	NS16-C12	9	Ж	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	KY210976
2	NS16-C13	4	Ж	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	KY210977
3	NS16-C32	7	Ж	GII.P21/GII.3	KY210919
4	NS16-C36	1	Ж	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210978
5	NS16-C37	4	М	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210979
6	NS16-C38	3	М	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210980

штаммы Hu/GII.Pe-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C13/2016 (GenBank KY210977) и Hu/GII.P21-GII.3/RUS/Novosibirsk/NS16-C23/2016 (GenBank KY210919).

Для изолята NS16-C38 была определена полная нуклеотидная последовательность генома (7560 н.), включая 3'-нетранслируемую (47 н.) область, которая зарегистрирована как штамм Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980). Анализ выведенных аминокислотных последовательностей показал, что ORF1 (5100 н.) кодировала полипротеин длиной 1700 аминокислотных остатков (а.о.); ORF2 (1623 н.) и ORF3 (807 н.) кодировали капсидные белки VP1 (541 а.о.) и VP2 (269 а.о.) соответственно. Полная нуклеотидная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 имела высокую степень гомологии (98–99 %) с последовательностями рекомбинантных штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012, появившихся в США и Великобритании в зимнем сезоне 2015/2016. Поскольку исследуемый штамм был рекомбинантным, сравнительный молекулярно-генетический анализ проводился отдельно для каждой ORF.

Сравнительный анализ ORF1

Филогенетический анализ доступных в GenBank полных нуклеотидных последовательностей ORF1 с полимеразой генотипа GII.P16 показал, что изучаемые штаммы разделились на три кластера (I, II и III), внутри которых с индексами поддержки >85 % отдельные клады были сформированы штаммами с одинаковым генотипом VP1 (рис. 1). Кластер III содержал современные рекомбинантные штаммы, у которых полимеразы генотипа GII.P16 была в сочетании с VP1 четырех различных генотипов – GII.1, GII.2, GII.3 и GII.4_Sydney_2012. Гомология ORF1 российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 со штаммами кластера III составила 97.9–99 %.

При сравнительном анализе обнаружено, что длина полных последовательностей ORF1 у штаммов с полимеразой генотипа GII.P16 варьировала от 5094 н. (референсный штамм AY772730_Hu/GII.P16-GII.16/DEU/Neustrelitz/2000) до 5100 н. (кластер III). В результате выравнивания анализируемых последовательностей у рекомбинантных штаммов генотипа GII.P16/GII.17 (кластер I) и у всех штаммов из кластера II была обнаружена вставка

триплета GAA в регионе, кодирующем неструктурный белок p48 (N-terminal protein p48). У современных рекомбинантных штаммов из кластера III в этой же области гена белка p48 была выявлена вставка еще одного триплета GAA или GGA. В ходе анализа нуклеотидных последовательностей ORF1 определено 1317 (25.8 %) переменных сайтов, из которых 906 (17.7 %) были информативными, т. е. встречались в двух и более штаммах.

При анализе выведенных аминокислотных последовательностей полипротеина обнаружено 182 (10.7 %) переменных сайта, из которых 104 (6.1 %) были информативными (табл. 2). Согласно сравнительному анализу, 14 переменных сайтов специфичны для новой появившейся линии полимеразы генотипа GII.P16 (кластер III), причем замены в семи позициях (52, 53, 644, 845, 853, 1546 и 1549) приводили к изменению класса аминокислоты. При оценке функциональной значимости обнаруженных изменений было определено, что три несинонимичные замены (в позициях 52, 53 и 165) и вставка ⁷⁷E/G обнаружены в белке p48, который играет роль в процессе проникновения вируса через мембрану клетки-хозяина (Fernandez-Vega et al., 2004). Из пяти несинонимичных замен, произошедших в полимеразе GII.P16, четыре (в позициях 1482, 1521, 1546 и 1549) были расположены в ее активном центре (см. табл. 2), и это, возможно, повлияло на трансмиссивность вируса.

Сравнительный анализ ORF2

Помимо последовательностей, определенных в этой работе, в филогенетический анализ ORF2 были включены штаммы различных капсидных генотипов, выявленные в комбинации с полимеразой генотипа GII.P16. На филогенетическом дереве частичных нуклеотидных последовательностей ORF2 видно, что анализируемые штаммы сформировали отдельные кластеры в соответствии с генотипом капсидного белка, внутри которых далее разделились на отдельные клады в зависимости от генотипа RdRp (рис. 2).

Нуклеотидные последовательности штаммов генотипа GII.4 разделились на две большие клады. Первая, наиболее полиморфная клада объединила штаммы с полимеразой генотипа GII.P4, которые ранее циркулировали в Новосибирске и относились к шести различным эпидемическим вариантам генотипа GII.4: Farmington_

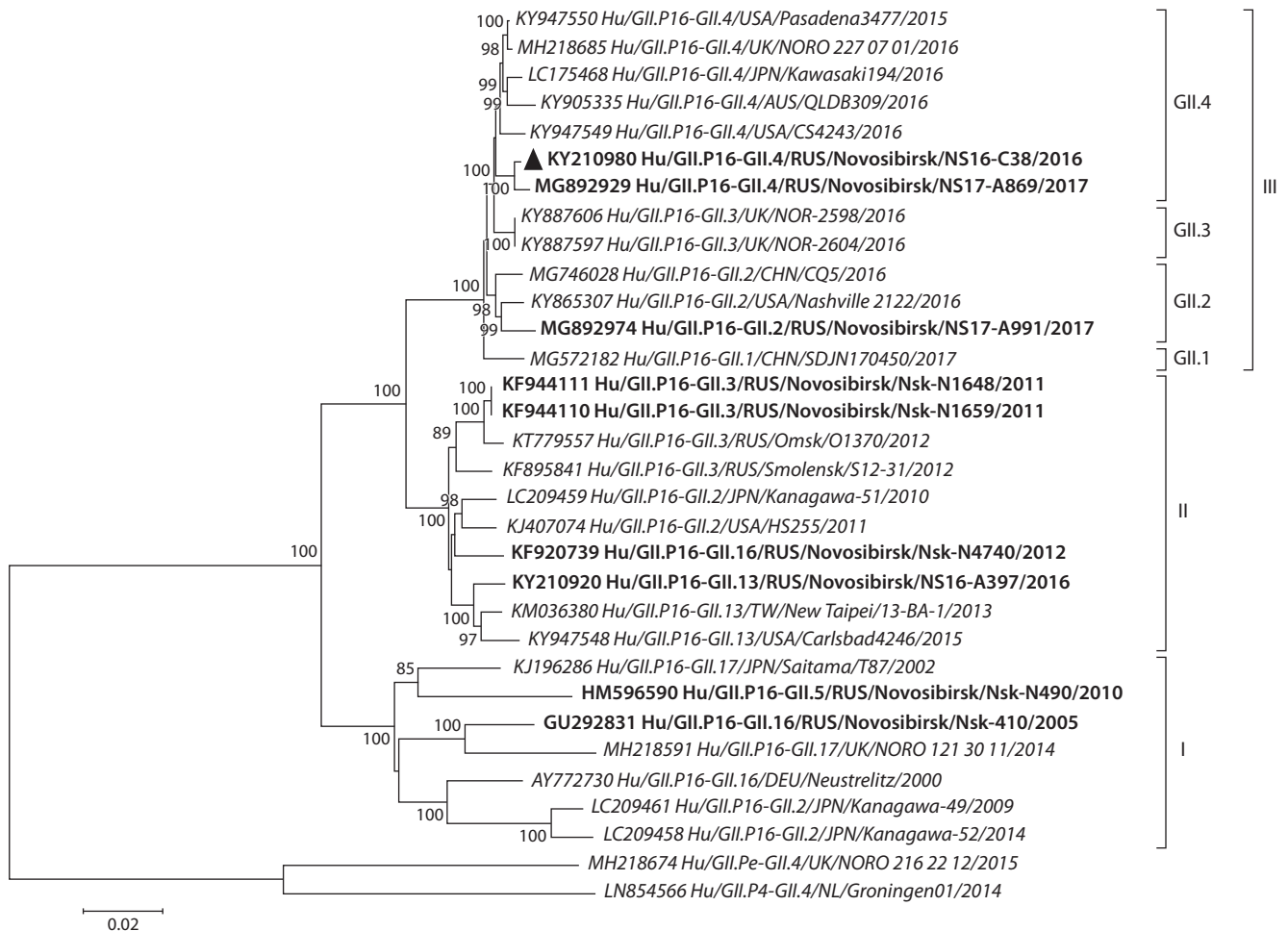


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных (5100 н.) последовательностей ORF1 норовирусов с GII.P16 RdRp. Новосибирские штаммы выделены жирным шрифтом, анализируемый штамм отмечен треугольником. Референсные штаммы обозначены курсивом; внешними последовательностями служат штаммы с полимеразой GII.P4 и GII.Pe.

Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, Apeldoorn_2007 и New-Orleans_2009 (Zhirakovskaia et al., 2015). Вторую кладу сформировали штаммы с генотипом капсида GII.4_Sydney_2012, которые далее с высоким индексом поддержки (99–100 %) разделились на два отдельных кластера – GII.Pe и GII.P16 в зависимости от генотипа полимеразы.

Гомология ORF2 российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 со штаммами генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов составила 98.8–99%. При сравнении полных нуклеотидных последовательностей ORF2 штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012 с вариантами GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P4/GII.4_New_Orleans_2009 было обнаружено 236 (14.5 %) переменных сайтов, из которых 132 (8.1 %) оказались информативными. Анализ выведенных аминокислотных последовательностей капсидного белка VP1 показал, что у варианта GII.4_Sydney_2012 можно выделить восемь характерных переменных позиций (15, 310, 341, 359, 368, 373, 377 и 396), отличающих их от варианта GII.4_New_Orleans_2009. Из них два сайта (позиции 368 и 373) были расположены в гипервариабельном эпитопе А (табл. 3). Следует отметить, что только один переменный

сайт в позиции 540 был специфичен для нового варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012, однако он не располагался в антигенных регионах основного белка капсида VP1.

Сравнительный анализ ORF3

Филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей ORF3 штаммов с полимеразой генотипа GII.P16 показал, что рассматриваемые последовательности разделились на отдельные кластеры в зависимости от генотипа VP1 (рис. 3). В рамках каждого генотипа VP1 штаммы с разными генетическими вариантами RdRp были сгруппированы в отдельные клады. В результате сравнения полных нуклеотидных последовательностей ORF3 штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012 с вариантами GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P4/GII.4_New_Orleans_2009 выявлено 109 (13.5 %) переменных сайтов, из которых 55 (6.8 %) были информативными.

В ходе анализа выведенных аминокислотных последовательностей минорного капсидного белка VP2 у штаммов варианта GII.4_Sydney_2012 выявлено восемь характерных переменных сайтов в позициях 81, 108, 148, 149, 158, 164, 205 и 241 (табл. 4), отличающих их от варианта GII.4_New_Orleans_2009. Кроме этого, еще два переменных

Таблица 2. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей N-терминального белка р48 и РНК-зависимой РНК полимеразы GII.P16 различных штаммов норовируса GII

GenBank ID/Genotype/Country/Year	Белок		р48																																		
	Кластер ^b	Позиция а.о. ^a	←																																		
			9	47	51	52	53	57	67	68	73	77	78	82	85	89	91	96	105	106	132	161	165	168	169	188	191	223	248	275	305	312	327	328			
AY772730 GII.P16-GII.16/DEU/2000	I	9	S	P	D	N	S	P	R	V	P	-	-	V	F	S	I	E	V	T	L	I	K	M	T	D	R	S	M	I	L	F	G	E			
GU292831 GII.P16-GII.16/RUS/2005			T	I	.	.	.	A	R	.	.	.	K		
LC209461 GII.P16-GII.2/JPN/2009			T	I	D	.	I	.	.	L	A	.	K	.	I	.	F	Y	.	.	
LC209458 GII.P16-GII.2/JPN/2014			T	.	.	.	P	I	D	A	.	I	.	.	L	A	.	K	.	.	F	Y	.	.	
KJ196286 GII.P16-GII.17/JPN/2002			I	.	.	.	E	E	K	
MH218591 GII.P16-GII.17/UK/2014			T	I	.	.	E	A	A	K	
HM596590 GII.P16-GII.5/RUS/2010	T	S	K	I	.	.	.	K	.	.	G	V	.	M	E	K	.	V				
KF920739 GII.P16-GII.16/RUS/2012	II	9	T	E	Y	A	.	.	.	L	E	.	N	.	L	D			
KM036380 GII.P16-GII.13/TW/2013			T	I	.	.	E	Y	A	.	.	.	L	E	.	N	.	L	D		
KY210920 GII.P16-GII.13/RUS/2016			T	I	.	E	Y	N	A	.	.	.	L	E	.	N	.	L	D		
LC209459 GII.P16-GII.2/JPN/2010			N	S	I	.	E	Y	A	.	.	.	L	A	E	.	N	.	L	.	.	E	D		
KJ407074 GII.P16-GII.2/USA/2011			N	S	I	.	E	A	Y	G	A	.	.	.	L	A	E	.	N	V	L	.	E	D			
KF944111 GII.P16-GII.3/RUS/2011			T	I	S	.	E	Y	V	A	.	V	.	L	E	.	N	.	L	D		
KF944110 GII.P16-GII.3/RUS/2011			T	I	S	.	E	Y	V	A	.	V	.	L	E	.	N	.	L	D		
KT779557 GII.P16-GII.3/RUS/2012			T	L	I	S	.	E	Y	V	A	.	V	.	L	E	.	N	.	L	D		
KF895841 GII.P16-GII.3/RUS/2012			T	I	S	.	E	Y	V	A	.	V	.	L	E	.	N	.	L	D	
KY947549 GII.P16-GII.4/USA/2016			III	9	T	.	E	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D	
KY210980 GII.P16-GII.4/RUS/NS16-C38/2016	T	.			G	E	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D		
MG892929 GII.P16-GII.4/RUS/NS17-A869/2017	T	.			G	E	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D	
KY947550 GII.P16-GII.4/USA/2015	T	.			E	P	.	.	.	I	.	G	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D	
MH218685 GII.P16-GII.4/UK/2016	T	.			E	P	.	.	.	I	.	G	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D	
LC175468 GII.P16-GII.4/JPN/2016	T	.			E	P	.	.	.	I	.	G	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D	
KY887606 GII.P16-GII.3/UK/2016	T	.			E	P	L	K	I	.	.	E	E	Y	A	.	R	L	A	E	.	.	L	D	
KY887597 GII.P16-GII.3/UK/2016	T	.			E	P	L	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	A	E	.	.	L	D	
MG746028 GII.P16-GII.2/CHN/2016	T	.			.	K	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	V	R	L	E	.	.	L	D	
KY865307 GII.P16-GII.2/USA/2016	T	.			.	K	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D
MG892974 GII.P16-GII.2/RUS/2017	T	.			.	K	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D
MG572182 GII.P16-GII.1/CHN/2017	T	.			.	K	P	.	.	I	.	E	E	Y	A	.	R	L	E	.	.	L	D

GenBank ID/Genotype/Country/Year	Белок		RdRp																														
	Кластер ^b	Позиция а.о. ^a	←																														
			1223	1268	1270	1310	1312	1314	1326	1335	1340	1362	1364	1367	1382	1387	1404	1463	1482	1501	1515	1521	1546	1549	1552	1575	1585	1616	1691				
AY772730 GII.P16-GII.16/DEU/2000	I	1223	T	R	S	H	H	A	I	K	F	D	I	R	V	A	V	T	S ^c	T	N	V ^c	K ^c	T ^c	R	D	S	N	S				
GU292831 GII.P16-GII.16/RUS/2005			Y	.	K		
LC209461 GII.P16-GII.2/JPN/2009			T	R	.	.	K	.	I	.	.	S	
LC209458 GII.P16-GII.2/JPN/2014			T	.	.	.	K	.	I	.	.	S	
KJ196286 GII.P16-GII.17/JPN/2002			.	K	N	.	.	V	V	K	I	N	.	.	.	
MH218591 GII.P16-GII.17/UK/2014			Y	.	.	K	K	.	S	.	.	
HM596590 GII.P16-GII.5/RUS/2010	.	K	N	Y	.	V	T	K	I	A	S	.	.			
KF920739 GII.P16-GII.16/RUS/2012	II	1223	.	K	.	.	.	V	T	R	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	.	.	.	K	N	T	.	N				
KM036380 GII.P16-GII.13/TW/2013			V	T	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	.	.	.	K	N	T	.	N			
KY210920 GII.P16-GII.13/RUS/2016			.	.	.	Y	V	T	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N			
LC209459 GII.P16-GII.2/JPN/2010			V	T	.	.	.	K	I	S	.	V	.	A	K	K	N	T	.	N		
KJ407074 GII.P16-GII.2/USA/2011			Y	V	T	V	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KF944111 GII.P16-GII.3/RUS/2011			M	.	Y	.	V	T	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KF944110 GII.P16-GII.3/RUS/2011			M	.	Y	.	V	T	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KT779557 GII.P16-GII.3/RUS/2012			M	.	T	.	V	T	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KF895841 GII.P16-GII.3/RUS/2012			V	T	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
NC039477 GII.P16-GII.4/GBR/2016			III	1223	V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY947549 GII.P16-GII.4/USA/2016					V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N	
KY210980 GII.P16-GII.4/RUS/NS16-C38/2016					V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N
MG892929 GII.P16-GII.4/RUS/NS17-A869/2017					V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N
KY947550 GII.P16-GII.4/USA/2015					V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N
MH218685 GII.P16-GII.4/UK/2016	V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
LC175468 GII.P16-GII.4/JPN/2016	T	.	.	.	E	V	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY887606 GII.P16-GII.3/UK/2016	V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	S	N		
KY887597 GII.P16-GII.3/UK/2016	V	T	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	S	N		
MG746028 GII.P16-GII.2/CHN/2016	.	.			.	Y	V	T	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY865307 GII.P16-GII.2/USA/2016	.	.	Y	.	V	T	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N				
MG892974 GII.P16-GII.2/RUS/2017	V	T	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N				
MG572182 GII.P16-GII.1/CHN/2017	.	G	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N				

^a Позиции, в которых замены а.о. были выявлены в двух и более штаммах.

^b Кластер на филогенетическом дереве ORF1 (см. рис. 1).

^c Активный сайт норовирусной RdRp (Ruis et al., 2017)

Таблица 3. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей VP1 норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.4_New_Orleans_2009

GenBank ID/Country/Year	Домен VP1 Генотип норовируса	Shell (S)										Protruding P2										P1	
		Позиция а.о. ^a																					
		15	119	145	174	297	309	310	333	340	341	359	368	372	373	377	393	396	414	539	540		
JN595867 USA/2010 KP244321 ITA/2012	GII.P4/GII.4_New Orleans_2009	T	I	I	P	R ^b	N	S	V	T	N	S	A ^b	D ^b	N ^b	T	S ^c	P ^c	H	A	L		
KC175323 HK/2012 KJ451059 TW/2013 KU311158 CAN/2014 MH218674 UK/2015 KU678203 TW/2016	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	A	V	V	.	.	S	N	.	.	D	A	E	.	R	A	.	H	P	.	.		
KY210977 RUS/NS16-C13/2016 MG214988 CHN/2017		A	V	V	S	H	S	N	.	.	D	A	E	N	H	A	G	H	P	.	.		
KY947550 USA/2015 KY887603 UK/2015 MH922874 CAN/2016 LC325217 JPN/2016 MK213541 AUS/2016	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	A	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		
KY210980 RUS/NS16-C38/2016 MG892929 RUS/NS17-A869/2017		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V		

^a Позиции, в которых замены а.о. были выявлены в двух и более штаммах.

^b Гипервариабельный эпитоп A (Mallory et al., 2019).

^c Вариабельный эпитоп D, который регулирует аффинность к HBGA (Mallory et al., 2019).

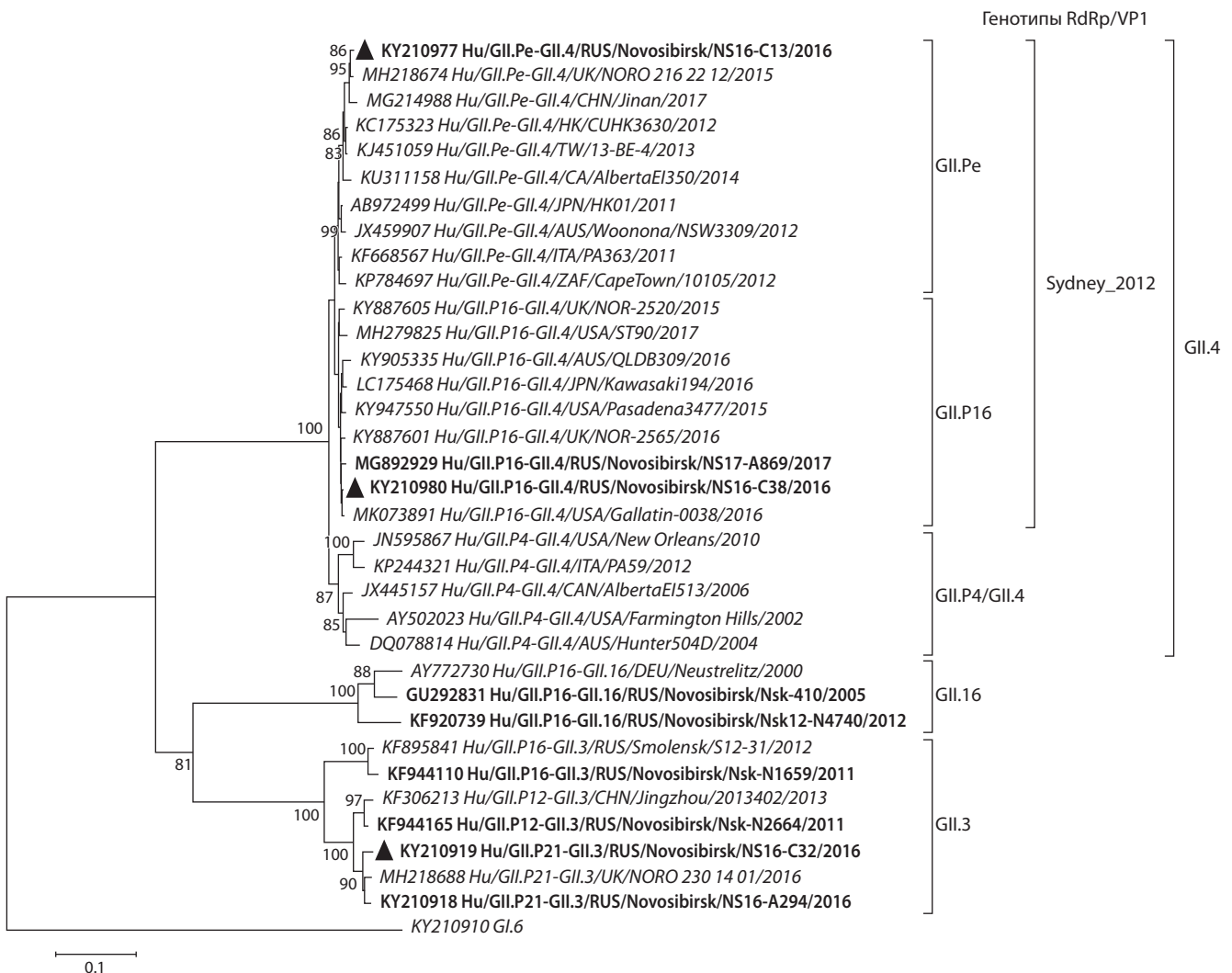


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных (807 н.) последовательностей ORF3 норовирусов GII.

Таблица 4. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей VP2 норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.4_New_Orleans_2009

GenBank ID/Country/Year	Генотип норовируса	Позиция а.о.*																							
		51	73	81	108	139	148	149	155	157	158	164	174	191	205	241	268								
JN595867 USA/2010	GII.P4/GII.4_New Orleans_2009	S	K	R	T	A	A	T	S	S	T	I	T	L	N	V	V								
KP244321 ITA/2012		N							
AB972499 JPN/2011	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	N	.	K	A	V	D	A	.	.	K	T	.	.	S	I	.								
KC175323 HK/2012		N	R	K	A	V	D	A	.	.	K	T	.	F	S	I	A								
KU311158 CAN/2014		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	.	F	S	I	.								
MH218674 UK/2015		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	A	I	F	S	I	A								
KY210977 RUS/NS16-C13/2016		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	I	F	S	I	A								
MG214988 CHN/2017		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	I	F	S	I	.								
KY887605 UK/2015		GII.P16/GII.4_Sydney_2012	N	.	K	I	.	D	A	P	N	K	.	I	.	S	I	A							
KY947550 USA/2015	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								
KY887601 UK/2016	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								
KY905335 AUS/2016	N		.	.	A	.	D	A	P	N	K	A	I	.	S	I	.								
LC175468 JPN/2016	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								
MK073891 USA/2016	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								
KY210980 RUS/NS16-C38/2016	.		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								
MG892929 RUS/NS17-A869/2017	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.								

* Позиции, в которых замены а.о. были выявлены в двух и более штаммах.

ных сайта в позициях 155 и 157 были специфичны для нового варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012.

Обсуждение

Настоящая работа является частью многолетнего мониторинга генетического разнообразия норовирусов, ассоциированных со спорадическими случаями ОГЭ в Новосибирске. В марте 2016 г. в фекалиях госпитализированных детей впервые был выделен норовирус нового генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012. В образцах от госпитализированных взрослых этот генотип впервые детектирован осенью 2016 г. (GenBank KY210983, MG892912, MG892914). Поиск в базе данных GenBank показал, что в европейской части России подобные GII.4_Sydney_2012 норовирусы (GenBank MK033810–MK033811) были обнаружены в образцах детей из Нижнего Новгорода также в конце 2016 г.; к сожалению, генотип полимеразы для этих изолятов не определен.

Норовирусы с полимеразой генотипа GII.P16 долгое время считались не очень распространенными, хотя опубликованы сообщения о том, что норовирусы генотипа GII.P16/GII.2 вызвали локальные вспышки ОГЭ (2009/2010 и 2012/2014 гг.) в Японии (Iritani et al., 2012; Motomura et al., 2016), а генотипа GII.P16/GII.13 (2009/2010 г.) – в Непале (Hoа-Tran et al., 2015). За 10-летний период (2003–2012) мониторинга генотипов норовируса в Новосибирске (Zhirakovskaia et al., 2015) изоляты с полимеразой генотипа GII.P16 были выявлены всего в пяти образцах: GII.P16/GII.16 (GenBank GU292831, KF920739), GII.P16/GII.3 (GenBank KF944110, KF944111) и GII.P16/GII.5 (GenBank HM596590). До 2016 г. в Российской Федерации, кроме Новосибирска, норовирусы генотипа GII.P16/GII.3 в единичных случаях были выявлены в Омске (GenBank KT779557, KY362198) и Смоленске (GenBank KF895841), а генотипа GII.P16/GII.16 – в Москве и Санкт-Петербурге (GenBank FJ383842, FJ383877). В Новосибирске рекомбинантные норовирусы с новой полимеразой генотипа GII.P16, которая отличалась от варианта 2010–2012 гг. и была в сочетании с капсидами нескольких генотипов (GII.13, GII.2 и GII.4_Sydney_2012), стали часто детекти-

роваться в образцах от взрослых пациентов с ОГЭ начиная с 2016 г. (данные не опубликованы). Наши результаты подтверждают гипотезу о распространении вновь возникших рекомбинантных штаммов норовируса с новой GII.P16 полимеразой в разных регионах мира (Barreira et al., 2017; Bidalot et al., 2017; Cannon et al., 2017; Choi et al., 2017; Ruis et al., 2017; Hata et al., 2018; Lun et al., 2018).

До начала этого исследования в международной базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномных последовательности российских штаммов норовируса рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.3 (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). В данной работе была определена полная нуклеотидная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 нового рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Сравнительный анализ показал, что уникальные изменения произошли в аминокислотных последовательностях двух неструктурных белков – N-терминальном белке р48 и полимеразе GII.P16, а также в минорном капсидном белке VP2. При этом существенных изменений в основном белке капсида VP1 генотипа GII.4_Sydney_2012 обнаружено не было.

РНК-зависимая РНК-полимераза играет критическую роль в репликации генома норовируса. Регион, кодирующий полимеразу, изменяется достаточно быстро, при этом наблюдается отличие в скорости накопления мутаций для различных генотипов (Ozaki et al., 2018). Полученные нами данные согласуются с гипотезой Ruis et al. (2017) о том, что необычное распространение по всему миру штаммов с новым вариантом полимеразы GII.P16 связано в основном с изменениями, произошедшими в активном центре полимеразы, которые могли повысить трансмиссивность норовируса. Однако мы предполагаем, что изменения в N-терминальном белке р48 тоже сыграли свою роль в распространении этого нового генетического варианта норовируса. Ранее было показано, что белок р48 может связываться в инфицированной клетке с факторами, ответственными за разрушение вируса (host restriction factors), способствуя уходу норовируса от иммунной системы, а кодирующий его регион имеет более высокую

скорость эволюции, чем геном норовируса в целом (Cotten et al., 2014). Кроме того, белок р48 способен блокировать местный секреторный иммунитет эпителиальных клеток кишечника, индуцировать дезинтеграцию аппарата Гольджи и нарушать внутриклеточный трафик белков (Fernandez-Vega et al., 2004; Roth, Karst, 2016). Мы предполагаем, что вставка глутаминовой кислоты в область, уже содержащую четыре последовательных остатка глутаминовой кислоты, увеличивает отрицательный заряд на N-конце белка р48, и это могло повлиять как на способность норовируса проникать через мембранные структуры эпителиальных клеток кишечника, так и на скорость дезинтеграции клеточного аппарата Гольджи.

Минорный белок капсида VP2, играя важную роль в процессе репликации вируса (Vongprunsawad et al., 2013) и в стабильности вириона (Lin et al., 2014), также участвует в модуляции иммунного ответа хозяина (Roth, Karst, 2016). Скорость накопления мутаций в этом белке превышает таковую для основного белка капсида VP1 (Cotten et al., 2014). Выявленные нами аминокислотные замены могли повлиять на способность VP2 подавлять презентацию антигенов на клеточных мембранах и общую индукцию защитного иммунитета человека.

Закключение

В результате многолетнего мониторинга генотипов RdRp/VP1 норовирусов было зафиксировано появление в России нового рекомбинантного варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Проведенный анализ показал, что распространение GII.P16/GII.4_Sydney_2012 не связано с изменением антигенного профиля основного капсидного белка VP1 норовируса, которое обычно приводило к появлению новых эпидемических вариантов GII.4. В случае GII.P16/GII.4_Sydney_2012, вероятно, определенную роль сыграли изменения в минорном белке VP2, которые могли повлиять на антигенный состав вириона и способствовали уходу от иммунного ответа. Кроме того, накопление мутаций в неструктурных белках – N-терминальном белке р48 и полимеразе, возможно, повысило трансмиссивность норовирусов с новым вариантом полимеразы GII.P16. Дальнейший мониторинг генотипов позволит оценить распространение вновь возникших рекомбинантных норовирусов с новой полимеразой GII.P16 на территории Российской Федерации и предсказать эпидемический потенциал появившихся штаммов.

Список литературы / References

Ahmed S.M., Hall A.J., Robinson A.E., Verhoef L., Premkumar P., Parashar U.D., Koopmans M., Lopman B.A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014;14(8):725-730. DOI 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.

Barreira D.M.P.G., Fumian T.M., Tonini M.A.L., Volpini L.P.B., Santos R.P., Ribeiro A.L.C., Leite J.P.G., Souza M.T.B.M., Brasil P., da Cunha D.C., Miagostovich M.P., Spano L.C. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One.* 2017; 12(12):e0189504. DOI 10.1371/journal.pone.0189504.

Bartsch S.M., Lopman B.A., Ozawa S., Hall A.J., Lee B.Y. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One.* 2016;11(4): e0151219. DOI 10.1371/journal.pone.0151219.

Bidalot M., Théry L., Kaplon J., de Rougemont A., Ambert-Balay K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22(15):pii=30508. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30508.

Brown J.R., Roy S., Shah D., Williams C.A., Williams R., Dunn H., Hartley J., Harris K., Breuer J. Norovirus transmission dynamics in a pediatric hospital using full genome sequences. *Clin. Infect. Dis.* 2019;68(2):222-228. DOI 10.1093/cid/ciy438.

Brown J.R., Roy S., Tutill H., Williams R., Breuer J. Super-infections and relapses occur in chronic norovirus infections. *J. Clin. Virol.* 2017;96:44-48. DOI 10.1016/j.jcv.2017.09.009.

Bull R.A., White P.A. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol.* 2011;19:233-240. DOI 10.1016/j.tim.2011.01.002.

Cannon J.L., Barclay L., Collins N.R., Wikswo M.E., Castro C.J., Magana L.C., Gregoricus N., Marine R.L., Chhabra P., Vinje J. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2017;55(7):2208-2221. DOI 10.1128/JCM.00455-17.

Choi Y.S., Koo E.S., Kim M.S., Choi J.D., Shin Y., Jeong Y.S. Re-emergence of a GII.4 norovirus Sydney 2012 variant equipped with GII.P16 RdRp and its predominance over novel variants of GII.17 in South Korea in 2016. *Food Environ. Virol.* 2017;9(2):168-178. DOI 10.1007/s12560-017-9278-4.

Cotten M., Petrova V., Phan M.V., Rabaa M.A., Watson S.J., Ong S.H., Kellam P., Baker S. Deep sequencing of norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting. *J. Virol.* 2014; 88(19):11056-11069. DOI 10.1128/JVI.01333-14.

de Graaf M., van Beek J., Vennema H., Podkolzin A.T., Hewitt J., Bucardo F., Templeton K., Mans J., Nordgren J., Reuter G., Lynch M., Rasmussen L.D., Iritani N., Chan M.C., Martella V., Ambert-Balay K., Vinje J., White P.A., Koopmans M.P. Emergence of a novel GII.17 norovirus – end of the GII.4 era? *Euro Surveill.* 2015; 20(26):pii=21178. DOI 10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178.

Eden J.S., Tanaka M.M., Boni M.F., Rawlinson W.D., White P.A. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J. Virol.* 2013;87(11):6270-6282. DOI 10.1128/JVI.03464-12.

Fernandez-Vega V., Sosnovtsev S.V., Belliot G., King A.D., Mitra T., Gorbalenya A., Green K.Y. Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J. Virol.* 2004;78(9):4827-4837. DOI 10.1128/JVI.78.9.4827-4837.2004.

Green K.Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Racaniello V.R., Roizman B. (Eds.). *Fields Virology*. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013;582-608.

Han J., Wu X., Chen L., Fu Y., Xu D., Zhang P., Ji L. Emergence of norovirus GII.P16-GII.2 strains in patients with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2016–2017. *BMC Infect. Dis.* 2018;18(1):342. DOI 10.1186/s12879-018-3259-6.

Hata M., Nakamura N., Kobayashi S., Onouchi A., Saito T., Hirose E., Adachi H., Saito N., Ito M., Yasui Y., Matsumoto M., Minagawa H. Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 in Aichi, Japan, during the 2016/17 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018;71(4):319-322. DOI 10.7883/yoken.JJID.2017.520.

Hoang-Tran T.N., Nakagomi T., Sano D., Sherchand J.B., Pandey B.D., Cunliffe N.A., Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses detected in Nepalese children with acute diarrhea between 2005 and 2011: increase and predominance of minor genotype GII.13. *Infect. Genet. Evol.* 2015;30:27-36. DOI 10.1016/j.meegid.2014.12.003.

Hoang-Tran T.N., Trainor E., Nakagomi T., Cunliffe N.A., Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 2013;56(3):269-277. DOI 10.1016/j.jcv.2012.11.011.

Iritani N., Kaida A., Abe N., Sekiguchi J., Kubo H., Takakura K., Goto K., Ogura H., Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009–2010 season in Osaka City, Japan. *J. Med. Virol.* 2012;84(3):517-525. DOI 10.1002/jmv.23211.

- Kirby A.E., Teunis P.F., Moe C.L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 2015;211(1):166-167. DOI 10.1093/infdis/jiu385.
- Kroneman A., Vega E., Vennema H., Vinje J., White P.A., Hansman G., Green K., Martella V., Katayama K., Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 2013; 158:2059-2068. DOI 10.1007/s00705-013-1708-5.
- Lin Y., Fengling L., Lianzhu W., Yuxiu Z., Yanhua J. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J. Microbiol.* 2014;52(11): 970-975. DOI 10.1007/s12275-014-4323-6.
- Lun J.H., Hewitt J., Yan G.J.H., Enosi T.D., Rawlinson W.D., White P.A. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 was the dominant norovirus identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses.* 2018; 10(10):548. DOI 10.3390/v10100548.
- Mallory M.L., Lindesmith L.C., Graham R.L., Baric R.S. GII.4 human norovirus: surveying the antigenic landscape. *Viruses.* 2019;11(2): 177. DOI 10.3390/v11020177.
- Motomura K., Boonchan M., Noda M., Tanaka T., Takeda N. Norovirus epidemics caused by new GII.2 chimera viruses in 2012–2014 in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2016;42:49-52. DOI 10.1016/j.meegid.2016.04.026.
- Ozaki K., Matsushima Y., Nagasawa K., Motoya T., Ryo A., Kuroda M., Katayama K., Kimura H. Molecular evolutionary analyses of the RNA-dependent RNA polymerase region in norovirus genogroup II. *Front. Microbiol.* 2018;9:3070. DOI 10.3389/fmicb.2018.03070.
- Parra G.I., Squires R.B., Karangwa C.K., Johnson J.A., Lepore C., Sosnovtsev S.V., Green K.Y. Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity. *PLoS Pathog.* 2017; 13(1):e1006136. DOI 10.1371/journal.ppat.1006136.
- Petrignani M., Verhoef L., de Graaf M., Richardus J.H., Koopmans M. Chronic sequelae and severe complications of norovirus infection: a systematic review of literature. *J. Clin. Virol.* 2018;105:1-10. DOI 10.1016/j.jcv.2018.05.004.
- Qi R., Huang Y., Liu J., Sun Y., Sun X., Han H., Qin X., Zhao M., Wang L., Li W., Li J., Chen C., Yu X. Global prevalence of asymptomatic norovirus infection: a meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2018;2(2-3):50-58. DOI 10.1016/j.eclinm.2018.09.001.
- Roth A.N., Karst S.M. Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr. Opin. Virol.* 2016;16:24-30. DOI 10.1016/j.coviro.2015.11.005.
- Ruis C., Roy S., Brown J.R., Allen D.J., Goldstein R.A., Breuer J. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179572. DOI 10.1371/journal.pone.0179572.
- Simmons K., Gambhir M., Leon J., Lopman B. Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19(8):1260-1267. DOI 10.3201/eid1908.130472.
- Towers S., Chen J., Cruz C., Melendez J., Rodriguez J., Salinas A., Yu F., Kang Y. Quantifying the relative effects of environmental and direct transmission of norovirus. *R. Soc. Open Sci.* 2018;5(3):170602. DOI 10.1098/rsos.170602.
- van Beek J., Ambert-Balay K., Botteldoorn N., Eden J.S., Fonager J., Hewitt J., Iritani N., Kroneman A., Vennema H., Vinje J., White P.A., Koopmans M., on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance.* 2013; 18(1):pii=20345. Available online: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.18.01.20345-en>.
- Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(2):373-381. DOI 10.1128/JCM.01535-14.
- Vongpunsawad S., Venkataram Prasad B.V., Estes M.K. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J. Virol.* 2013;87(9):4818-4825. DOI 10.1128/JVI.03508-12.
- Woodward J., Gkrania-Klotsas E., Kumararatne D. Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2017;188(3):363-370. DOI 10.1111/cei.12884.
- Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Y., Bodnev S.A., Klemesheva V.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003–2012. *J. Med. Virol.* 2015;87(5):740-753. DOI 10.1002/jmv.24068.
- Zhirakovskaia E., Tikunov A., Tymentsev A., Sokolov S., Sedelnikova D., Tikunova N. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2019;67:167-182. DOI 10.1016/j.meegid.2018.11.006.

ORCID ID

E.V. Zhirakovskaia orcid.org/0000-0001-6787-8393
A.Y. Tikunov orcid.org/0000-0001-5613-5447
E.I. Krasnova orcid.org/0000-0003-2625-5442
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Благодарности. Работа поддержана проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 (№ АААА-Ф17-117020210027-9). Авторы выражают благодарность медицинскому персоналу Детской городской клинической больницы № 3 за сбор образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.05.2019. После доработки 13.06.2019. Принята к публикации 23.06.2019.