



Оценка генетического разнообразия возбудителя норовирусной инфекции в пунктах временного размещения беженцев в Ростовской области в 2022 году с помощью онлайн-программы NoroNetRus

А.С. Водопьянов¹, Р.В. Писанов¹, С.О. Водопьянов¹, О.С. Чемисова¹,
А.А. Герасименко¹, А.К. Носков¹, С.С. Слись², С.А. Ненадская², А.Д. Коренева²,
А.В. Коломойцева², Е.В. Ковалев², А.Р. Литовко³, Н.В. Половинка³

¹ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ул. М. Горького, д. 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Российская Федерация

² Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, ул. 18-я линия, д. 17, г. Ростов-на-Дону, 344019, Российская Федерация,

³ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора, ул. 7-я линия, д. 67, г. Ростов-на-Дону, 344019, Российская Федерация

Резюме

Введение. Очевидно, что эффективное расследование вспышек норовирусной инфекции невозможно без методов, способных дифференцировать генотипы возбудителя, основным из которых является определение типа капсида и полимеразы на основе данных секвенирования. Однако в последнее время наблюдается неустойчивая работа международных сервисов по оценке геномов норовируса с ряда IP-адресов, находящихся в Российской Федерации, что может оказать влияние на оперативность расследования вспышек норовирусной инфекции в нашей стране.

Цель – разработка отечественного программного обеспечения для генотипирования норовирусов и оценка с его помощью генетического разнообразия возбудителя норовирусной инфекции, выявленного в 2022 году в Ростовской области. **Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили образцы фекалий от 210 больных с симптомами острых кишечных инфекций из пунктов временного размещения беженцев и детских организованных коллективов. Контингент обследуемых – пациенты в возрасте от 1 месяца до 74 лет с симптомами острых кишечных инфекций в 2022 г. Выявление РНК возбудителя норовирусной инфекции проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» (Москва, Россия). Фрагментарное секвенирование проводили на геномном анализаторе SeqStudio (Thermo Fisher, США). Авторское программное обеспечение разрабатывали на языках программирования Java и Python.

Результаты. Создана отечественная программа NoroNetRus, позволяющая определять тип капсида и полимеразы норовируса исходя из данных секвенирования. Программа бесплатна и доступна в онлайн-формате по адресу: <http://antiplague.ru/noronetrus>. Проведенное фрагментарное секвенирование последовательностей гена VP1 для 25 образцов норовируса показало, что они принадлежали трем разным генотипам (GII.4 Sydney, GII.10 и GII.17), причем генотип GII.10, в свою очередь, распределился между двумя разными кластерами. Полученные данные свидетельствуют о существовании как минимум четырех различных источников инфицирования.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции в 2022 году в Ростовской области как минимум четырех различных генотипов возбудителя норовирусной инфекции.

Ключевые слова: норовирус, секвенирование, генотипирование, программное обеспечение.

Для цитирования: Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Герасименко А.А., Носков А.К., Слись С.С., Ненадская С.А., Коренева А.Д., Коломойцева А.В., Ковалев Е.В., Литовко А.Р., Половинка Н.В. Оценка генетического разнообразия возбудителя норовирусной инфекции в пунктах временного размещения беженцев в Ростовской области в 2022 году с помощью онлайн-программы NoroNetRus // Здоровье населения и среда обитания. 2022. Т. 30. № 11. С. 82–88. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-11-82-88>

Сведения об авторах:

✉ **Водопьянов Алексей Сергеевич** – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: vodopyanov_as@antiplague.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Писанов Руслан Вячеславович – к.м.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Водопьянов Сергей Олегович – д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

Чемисова Ольга Сергеевна – к.б.н., заведующий лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>.

Герасименко Артем Андреевич – младший научный сотрудник лаборатории ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7700-3483>.

Носков Алексей Кимович – к.м.н., директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: noskov-epid@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>.

Слись Сергей Сергеевич – главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2649-8949>.

Ненадская Светлана Алексеевна – начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4690-4713>.

Коренева Анастасия Дмитриевна – главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1468-0997>.

Коломойцева Алина Владимировна – ведущий специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6889-2418>.

Ковалев Евгений Владимирович – руководитель Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>.

Литовко Анна Радиковна – заведующий лабораторией вирусологических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1273-3565>.

Половинка Нина Владимировна – заведующий отделом эпидемиологии и экспертизы ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»; e-mail: master@donses.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5184-126X>.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Носков А.К., Ковалев Е.В.; сбор данных: Чемисова О.С., Ненадская С.А., Коренева А.Д., Коломойцева А.В., Литовко А.Р., Половинка Н.В.; проведение фрагментарного секвенирования: Писанов Р.В., Герасименко А.А.; анализ и интерпретация результатов: Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Слись С.С., Ненадская С.А., Коренева А.Д., Коломойцева А.В.; разработка программы NoroNetRus: Водопьянов А.С., Герасименко А.А., Писанов Р.В.; проведение валидации программы NoroNetRus: Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Литовко А.Р.; обзор литературы:

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Чемисова О.С.; подготовка проекта рукописи: Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Носков А.К., Чемисова О.С., Ковалев Е.В. Все авторы рассмотрели результаты и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнялась в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Исследование проведено на основе добровольного информированного согласия в соответствии с ФЗ от 21.11.2001 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Протокол исследования одобрен Комиссией по биомедицинской этике ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, протокол № 1 от 14 января 2022 г.

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Статья получена: 06.07.22 / Принята к публикации: 03.11.22 / Опубликовано: 29.11.22

Assessment of Genetic Diversity of Noroviruses Circulating in Temporary Accommodation Centers for Refugees in the Rostov Region in 2022 Using the NoroNetRus Online Software

Alexey S. Vodop'yanov,¹ Ruslan V. Pisanov,¹ Sergey O. Vodop'yanov,¹ Olga S. Chemisova,¹ Artem A. Gerasimenko,¹ Aleksey K. Noskov,¹ Sergey S. Slis,¹ Svetlana A. Nenadskaya,² Anastasia D. Koreneva,² Alina V. Kolomoitseva,² Evgeny V. Kovalev,² Anna R. Litovko,³ Nina V. Polovinka³

¹ Rostov-on-Don Plague Control Research Institute,
117/40 Maxim Gorky Street, Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

² Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 17, 18th Line Street, Rostov-on-Don, 344019, Russian Federation

³ Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region,
67, 7th Line Street, Rostov-on-Don, 344019, Russian Federation

Summary

Introduction: It is obvious that effective investigation of norovirus outbreaks is impossible without the use of methods enabling differentiation of pathogen genotypes, the principal of which is the determination of the type of capsid and polymerase based on sequencing data. Yet, unstable operation of international services for assessment of norovirus genomes from a number of IP addresses located in the Russian Federation has been noted recently, which may affect the efficiency and promptness of investigation of norovirus outbreaks in our country.

Objective: To develop domestic software for genotyping of noroviruses and further assessment of genetic diversity of noroviruses identified in the year 2022 in the Rostov Region.

Materials and methods: The materials for the study were stool samples from 210 patients with symptoms of gastrointestinal infections from temporary accommodation centers for refugees and children's centers. The study population included patients aged 1 month to 74 years with symptoms of acute bowel infections. Detection of the pathogen RNA was carried out using a reagent kit AmpliSens® OKI screen-FL (Moscow, Russia). Fragment sequencing was performed using a genomic analyzer SeqStudio (Thermo Fisher, USA). The authors' software was developed in the Java and Python programming languages.

Results: We developed a domestic NoroNetRus software allowing determination of the type of capsid and polymerase of noroviruses based on sequencing data. The software is free of charge and available online at <http://antiplague.ru/noronetrus>. The fragment analysis of VP1 gene sequences for 25 norovirus samples showed that they belonged to three different genotypes (GII.4 Sydney, GII.10, and GII.17), and the genotype GII.10, in its turn, was distributed between two different clusters. Our findings indicate the existence of at least four different sources of infection.

Conclusion: The data obtained indicate the circulation of at least four different genovariants of the causative agent of norovirus infection in the Rostov Region in 2022.

Keywords: norovirus, sequencing, genotyping, software.

For citation: Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Vodop'yanov SO, Chemisova OS, Gerasimenko AA, Noskov AK, Slis SS, Nenadskaya SA, Koreneva AD, Kolomoitseva AV, Kovalev EV, Litovko AR, Polovinka NV. Assessment of genetic diversity of noroviruses circulating in temporary accommodation centers for refugees in the Rostov Region in 2022 using the NoroNetRus online software. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2022;30(11):82–88. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-11-82-88>

Author information:

✉ Alexey S. Vodop'yanov, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: vodopyanov_as@antiplague.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Ruslan V. Pisanov, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Biology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Sergey O. Vodop'yanov, Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Microbiology of Cholera, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

Olga S. Chemisova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory "Collection of Pathogenic Microorganisms", Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>.

Artem A. Gerasimenko, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7700-3483>.

Aleksey K. Noskov, Cand. Sci. (Med.), Director, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; e-mail: noskov-epid@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>.

Sergey S. Slis, Chief Specialist/Expert, Department of Epidemiological Surveillance, Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor); e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2649-8949>.

Svetlana A. Nenadskaya, Head of the Department of Epidemiological Surveillance, Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor); e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4690-4713>.

Anastasia D. Koreneva, Chief Specialist/Expert, Department of Epidemiological Surveillance, Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor); e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1468-0997>.

Alina V. Kolomoitseva, Leading Specialist/Expert, Department of Epidemiological Surveillance, Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor); e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6889-2418>.

Evgeny V. Kovalev, Head of the Rostov Regional Office of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor); e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>.

Anna R. Litovko, Head of the Virology Laboratory, Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1273-3565>.

Nina V. Polovinka, Head of the Department of Epidemiology and Expertise, Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region; e-mail: master@donses.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5184-126X>.

Author contributions: study conception and design: Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Noskov A.K., Kovalev E.V.; data collection: Chemisova O.S., Nenadskaya S.A., Koreneva A.D., Kolomoitseva A.V., Litovko A.R., Polovinka N.V.; fragment analysis: Pisanov R.V., Gerasimenko A.A.;

analysis and interpretation of results: Vodop'ianov A.S., Vodop'ianov S.O., Pisanov R.V., Slis S.S., Nenadskaya S.A., Koreneva A.D., Kolomoitseva A.V.; development of the NoroNetRus software: Vodop'ianov A.S., Gerasimenko A.A., Pisanov R.V.; NoroNetRus validation: Vodop'ianov S.O., Chemisova O.S., Pisanov R.V., Litovko A.R.; literature review: Vodop'ianov S.O., Vodop'ianov A.S., Chemisova O.S.; draft manuscript preparation: Vodop'ianov A.S., Vodop'ianov S.O., Noskov A.K., Chemisova O.S., Kovalev E.V. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: The research was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent to participate in the study was obtained from the subjects in compliance with Federal Law No. 323-FZ of November 21, 2001 "On the fundamentals of health protection in citizens of the Russian Federation". The study design was approved by the Local Ethics Committee of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Minutes No. 1 of January 14, 2022.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Received: July 7, 2022 / Accepted: November 3, 2022 / Published: November 29, 2022

Введение. Норовирус является одной из ведущих причин острого небактериального эпидемического гастроэнтерита во всем мире, поскольку имеет несколько путей передачи и высокую устойчивость к дезинфицирующим средствам [1, 2]. Ежегодно в мире фиксируется миллиард случаев этой инфекции, среди которых 200 000 со смертельным исходом¹. В 2020 г. в Российской Федерации зарегистрировано 103 очага групповой заболеваемости НВИ с общим числом пострадавших 1480 человек (в 2019 г. — 215 и 2705 соответственно)².

Немаловажно, что смена или появление нового генотипа норовируса приводит к росту как спорадической, так и групповой заболеваемости вплоть до возникновения новых эпидемических вариантов вируса, склонных к быстрому распространению [3–5]. Норовирусы представляют собой группу генетически разнообразных, одноцепочечных РНК-вирусов. Род *Norovirus* относится к семейству *Caliciviridae* и содержит только один вид: вирус Norwalk.

В 2013 г. международная рабочая группа по классификации норовирусов предложила универсальную номенклатуру обозначения генотипа, включающую определение типа капсида (G-тип) и полимеразы (P-тип) [6]. Согласно современной классификации норовирусы подразделяются на десять геногрупп (GI–GVI) и 48 генотипов. Из этих семи геногрупп только GI, GII и GIV содержат человеческие норовирусы, причем вторая геногруппа (GII) встречается в 10 раз чаще [7]. Существует восемь генотипов капсида, принадлежащих GI, и 21, принадлежащий GII. С 2001 г. большинство вспышек во всем мире вызвано вирусами GII.4, хотя периодически появляются другие генотипы, такие как GII.17 и GII.2 [1].

Очевидно, что эффективное расследование вспышек норовирусной инфекции невозможно без методов, способных дифференцировать генотипы возбудителя, что может быть полезным при выявлении связей между отдельными очагами инфекции и путей передачи возбудителя.

Одним из наиболее широко распространенных подходов для оценки получаемых данных является использование онлайн программы Norovirus Genotyping tool, позволяющей быстро определять G и P тип вируса, исходя из данных секвенирования. Программа рассчитана на работу в режиме онлайн и расположена на сервере Национального института общественного здравоохранения и окружающей среды (Нидерланды) (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). Аналогичный сервис

представлен на сайте Centers for Disease Control and Prevention (США) (<https://norovirus.ng.philab.cdc.gov/bctyping.html>). Однако в последнее время наблюдается неустойчивая работа указанных сервисов и их периодическая недоступность с ряда IP-адресов, находящихся в Российской Федерации, что может оказать влияние на оперативность расследования вспышек НВИ в нашей стране. Помимо этого, одной из целей Указа Президента от 7 мая 2018 г. № 204³ «О национальных целях и стратегических задачах...» является использование преимущественно отечественного программного обеспечения государственными органами, органами местного самоуправления и организациями.

В связи с этим **цель** настоящего исследования состояла в разработке отечественного программного обеспечения для генотипирования норовирусов и оценке с его помощью генетического разнообразия возбудителя норовирусной инфекции, выявленного в 2022 г. в Ростовской области.

Материалы и методы. Контингент обследуемых — пациенты в возрасте от 1 месяца до 74 лет с симптомами острых кишечных инфекций (ОКИ) в 2022 г. Материалом для исследования послужили образцы фекалий от 210 больных с симптомами ОКИ из пунктов временного размещения беженцев и детских организованных коллективов. Все пациенты и их законные представители подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Выявление РНК возбудителя норовирусной инфекции проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» (Москва, Россия). Фрагментарное секвенирование проводили на геномном анализаторе SeqStudio (Thermo Fisher, США) с использованием праймеров, предложенных Cannon JL (2017).

Геномные последовательности возбудителя норовирусной инфекции для определения генотипов и создания собственного программного обеспечения получали из базы данных NCBI. Для сравнительного анализа геномов норовируса использовали программу Mega [8]. Для построения дендрограммы применяли алгоритм UPGMA. Авторское программное обеспечение разрабатывали на языках программирования Java и Python. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей в рамках создаваемого программного обеспечения использовали модуль Scikit [9].

Результаты. Первый этап работы состоял в составлении локальной базы данных референсных последовательностей. С этой целью были

¹ МУ 3.1.1.2969—11 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции»: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 36 с.

² Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266 (дата обращения: 10.04.2022).

³ Указ Президента РФ от 7 мая 2018 г. № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года» (с изменениями и дополнениями). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://base.garant.ru/71937200/> (дата обращения: 10.04.2022).

использованы обновленные данные по классификации норовирусов, предложенные Chhabra P и соавт. [10]. Для этого из базы данных NCBI были получены геномы норовируса каждого G и P типа, и после их выравнивания получены последовательности генов VP1 и RdPr.

Согласно предлагаемому нами алгоритму, каждая анализируемая последовательность норовируса поочередно выравнивается с помощью локального выравнивания по алгоритму Смитта – Ватермана с аффинными штрафами за вставки и делеции с каждой последовательностью из созданной локальной базы данных. В качестве критерия оценки используется количество совпавших нуклеотидов, что позволяет определить наиболее близкородственную референсную последовательность. Соответственно, поочередное проведение выравнивания с последовательностями генов капсида (VP1) и полимеразы (RdPr) позволяет определить G и P тип анализируемого норовируса.

С этой целью на языке программирования Python нами разработана программа NoroNetRus, предназначенная для работы в онлайн-формате, и расположена на сайте института по адресу: <http://antiplague.ru/noronetrus>. Внешний вид программы представлен на рис. 1.

Программа имеет интуитивно-понятный интерфейс, предназначена для работы через любой браузер с поддержкой JavaScript. В качестве входных данных используется fasta-файл, содержащий данные фрагментарного секвенирования норовируса. Время на анализ одной последовательности составляет от 0,5 до 3 секунд. Итогом работы программы являются типы генов VP1 и RdPr, например «Vp1: GII.17, RdRp: GII.P3».

Для валидации работы программы из базы данных NCBI нами были скачаны 100 случайных геномов норовируса и проведена виртуальная ПЦР *in silico* с праймерами, захватывающими фрагмент обоих генов [11]. Полученные ампликоны (фрагменты ДНК, ограниченные праймерами) были поочередно проверены в программах NoroNet (Нидерланды) и разработанной нами NoroNetRus.

По итогам валидации программа NoroNetRus на первом этапе определила G и P тип для всех последовательностей, в то время как алгоритм NoroNet (Нидерланды) не определил тип вируса для 8 последовательностей. В оставшихся 92 последовательностях обнаружено всего одно несоответствие — тип полимеразы в геноме вируса, депонированном в NCBI под номером KY424345, разработанная нами программа определила как GII.P7, в то время как программа NoroNet определила тип как GII.P6. Важным преимуществом является невозможность определения субтипов варианта капсида GII.4 при использовании программы NoroNet, что ограничивает возможности валидации. В то же время разработанная нами программа NoroNetRus успешно решает эту задачу.

При обследовании 210 пациентов с симптомами ОКИ в марте 2022 г. нами было выявлено 110 положительных проб, содержащих РНК норовируса в пяти эпидемических очагах. Два очага сформировались в пунктах временного размещения беженцев (ПВР-1 и ПВР-2), прибывших на территорию Ростовской области из Донецкой и Луганской народных республик. В этот же период было выявлено еще три очага в детских образовательных учреждениях (ДОУ) г. Ростова-на-Дону и г. Батайска. Для оценки генетического разнообразия нами проведено фрагментарное секвенирование участка гена VP1 (основной белок капсида) у 25 изолятов вируса.

Использование разработанной нами программы NoroNetRus позволило установить тип капсида для всех 25 образцов (таблица).

Обращает на себя внимание, что в ряде очагов циркулировали изоляты вируса, принадлежащие к одному генотипу: так, в ДОУ-А и ПВР-1 выявлена циркуляция генотипа GII.4 Sydney, а в ДОУ-Б — генотипа GII.10. В то же время в двух других очагах наблюдалась одновременная циркуляция сразу нескольких генотипов: в ДОУ-В выявлены генотипы GII.4 Sydney и GII.17, а в ПВР-2 — GII.4 Sydney и GII.10.

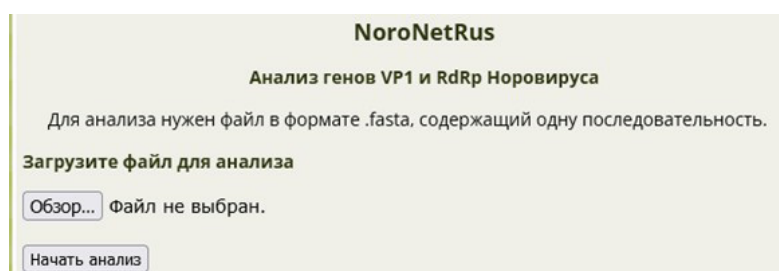


Рис. 1. Внешний вид стартового окна программы NoroNetRus

Fig. 1. The start window of the NoroNetRus software

Таблица. Генотипы изученных изолятов норовируса

Table. Genotypes of the norovirus isolates studied

Очаг / Focus	Количество изолятов с каждым типом капсида (ген VP1) / Number of isolates with each capsid type (VP1 gene)		
	GI.4 Sydney	GI.10	GI.17
ДОУ-А, г. Батайск / Children's Center A, Bataysk	10		
ДОУ-Б, г. Батайск / Children's Center B, Bataysk		3	
ДОУ-В, г. Ростов-на-Дону / Children's Center C, Rostov-on-Don	1		1
ПВР-1 / Refugee Center 1	6		
ПВР-2 / Refugee Center 2	2	2	

Для анализа мирового распространения норовируса из базы данных NCBI были получены 5947 последовательности гена VP1 различных штаммов и с помощью разработанного нами программно-обеспечения определен их генотип (рис. 2). Установлено, что наиболее распространенным в мире явился генотип GII.4 Sydney, к которому отнесено 17 % всех последовательностей. В России доминирующим явился генотип GII.3 (22 %), в то время как GII.4 Sydney занимает 4-е место по частоте встречаемости (12 %). За последние 5 лет выделение штаммов данного генотипа в России зарегистрировано в Новосибирске и Нижнем Новгороде.

Частота встречаемости генотипа GII.10 составила 0,02 % для мировой коллекции и 0,04 % — для России. За последние годы выделение штаммов GII.10 зарегистрировано в Испании (2019–2020 гг.) и Эфиопии (2016 г.). В России данный вариант выделялся в Челябинске в 2005 г.

Обсуждение. Норовирусы генотипа GII.17, по данным литературы, явились причиной вспышек в Хабаровском крае в 2015 г. и Амурской области в 2018 г. [12]. Интересно отметить, что норовирус GII.17 стал доминирующим генотипом в Осаке (Япония) [13], Южной Корее [14], Канаде [15], Италии [16], заменив генотип GII.4.

Вместе с тем на ряде территорий регистрируется одновременная циркуляция большого числа генотипов норовируса. Так, в Ботсване в период 2013–2015 гг., несмотря на доминирование генотипа GII.4, наблюдалось выделение минорных генотипов GII.2, GII.12, GI.9, GII.6, GII.10 [17]. Сходная ситуация наблюдалась в Эфиопии [18], Корее [19], ЮАР [20], Канаде [21].

Интересно, что отдельные вспышки, как правило, вызываются одним типом норовируса. Так, например, водная вспышка в г. Хабаровске в 2019 году была вызвана генотипом GII.P7-GII.6 [22]. Вспышка НВИ, ассоциированная с употреблением мороженого, инфекции в Бразилии в 2020 году была вызвана генотипом GII.12 [23]. Это позволяет использовать генотипирование в качестве удобного инструмента для выявления источника заражения, что и было с успехом продемонстрировано в Китае в 2017 году — проведенный анализ показал, что развитие вспышки норовируса GII.P17-GII.17 было связано с системой водоснабжения [24].

Для более точного анализа проведено выравнивание полученных фрагментов гена VP1 и построена дендрограмма, отражающая степень генетической близости между изучаемыми изолятами (рис. 3). К сожалению, в базе данных NCBI отсутствуют последовательности вируса, выделенные в Южном федеральном округе России и на Украине, что ограничивает возможности проведения анализа. При добавлении в перечень последовательностей штаммов из сопредельных государств наиболее генетически близкородственными оказались последовательности вируса, выделенного в Республике Беларусь в 2021 г. (данные не представлены).

Обращает на себя внимание, что по данным дендрограммы штаммы норовируса генотипа GII.10 образуют два разных кластера: в один кластер попали варианты вируса из ДОУ-Б, в другой — из ПВР-2. При проведении выравнивания нуклеотидных последовательностей 4774 (ПВР-2) и E1604 (ДОУ-Б) выявлено сходство 89,7 %, при этом между собой последовательности 4774 и 4779 совпадали на 100 %. Примечательно, что поиск с использованием алгоритма BLAST не нашел близкородственных штаммов для вирусов из ПВР-2, что может свидетельствовать о новом подтипе GII.10, не включенном в существующую международную классификацию.

Аналогичная гетерогенность внутри одного генотипа была показана ранее на примере норовируса GII.17. Так, было показано, что данный генотип можно разделить на четыре различные клады [25]. В последующем было установлено, что скорость эволюции гена VP1 норовируса генотипа составляет $1,14 \times 10^{-3}$ нуклеотидных замен/год [26].

Исследованные нами варианты норовируса GII.4 Sydney образовали единую группу, имея не более 0,5 % отличий друг от друга.

Заключение. Таким образом, в ходе проведенной работы был создан набор референсных последовательностей генов VP1 и RdPr норовируса второй геногруппы. Разработан алгоритм анализа данных секвенирования возбудителя норовирусной инфекции и создана отечественная программа NoroNetRus, позволяющая определять тип капсида и полимеразы норовируса, исходя из данных секвенирования. Программа бесплатна

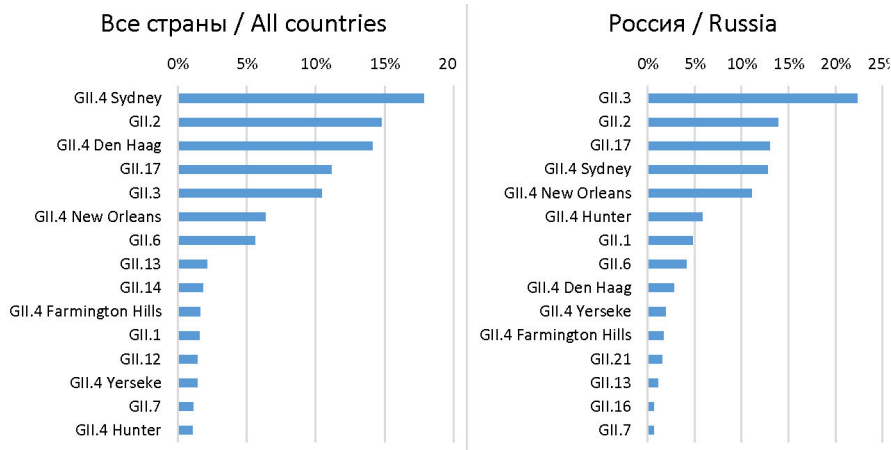


Рис. 2. Частота обнаружения различных генотипов в мире и в России (указаны первые 15 самых частых генотипов)

Fig. 2. Frequency of detection of 15 most frequent norovirus genotypes in the world and in Russia

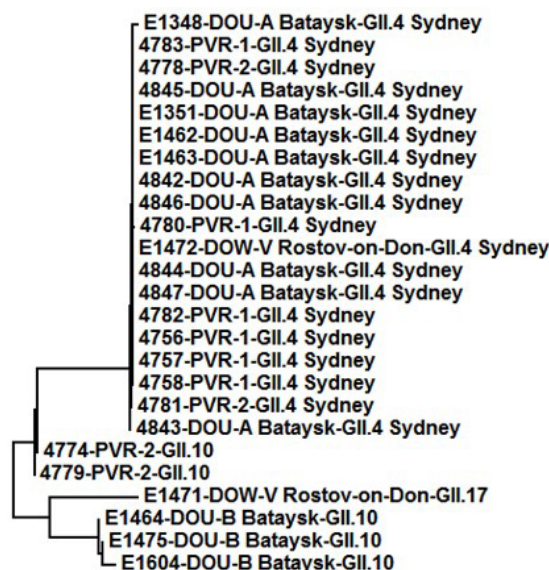


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе выравнивания фрагментов гена VP1. Для каждого изолята указаны номер, место выделения и генотип (алгоритм Neighbor Joining)

Примечание: PVR — пункт временного размещения беженцев; DOU — детский центр.

Fig. 3. Dendrogram based on alignment of VP1 gene fragments. For each isolate, the number, place of isolation, and genotype are shown (Neighbor Joining algorithm)

Notes: PVR — a temporary accommodation center for refugees; DOU — a children's center.

и доступна в онлайн-формате по адресу: <http://antiplague.ru/noronetrus>.

Проведена валидация работы программы с использованием 100 случайных последовательностей из базы данных NCBI, подтвердившая корректность проводимого анализа.

Было проведено фрагментарное секвенирование последовательностей гена VP1 для 25 образцов норовируса, выделенных в марте 2022 г. из пунктов временного размещения беженцев и детских образовательных учреждений (ДОУ) г. Ростова-на-Дону и г. Батайска. Показано, что они принадлежали к трем разным генотипам (GII.4 Sydney, GII.10 и GII.17), причем генотип GII.10, в свою очередь, распределился между двумя разными кластерами. Полученные данные свидетельствуют о существовании как минимум четырех различных источников инфицирования.

Список литературы / References

1. Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, *et al.* Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One*. 2015;10(12):e0142927. doi: 10.1371/journal.pone.0142927
2. Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е. и др. Генотипы норовирусов, обусловившие заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Хабаровском крае // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 7. С. 52–56.
3. Butakova LV, Sapaga EYu, Trotsenko OE, *et al.* Norovirus genotypes that caused cases of acute gastroenteritis in the Khabarovsk Region. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2018;(7(304)):52–56. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/3018-304-7-52-56
4. Medici MC, Tummo F, De Grazia S, *et al.* Epidemiological dynamics of norovirus GII.4 variant New Orleans 2009. *J Gen Virol*. 2015;96(9):2919–2927. doi: 10.1099/vir.0.000204
5. Chong PP, Atmar RL. Norovirus in health care and implications for the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(4):348–355. doi: 10.1097/QCO.0000000000000557
6. Kwok K, Niendorf S, Lee N, *et al.* Increased detection of emergent recombinant norovirus GII.P16–GII.2 strains in young adults, Hong Kong, China, 2016–2017. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(11):1852–1855. doi: 10.3201/eid2311.170561
7. Сапега Е.Ю., Бутакова Л.В., Троценко О.Е. и др. Эпидемиологические аспекты норовирусной инфекции на современном этапе // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2021. Т. 40. № 40. С. 72–78.
8. Sapaga EYu, Butakova LV, Trotsenko OE, Zaitseva TA, Kurganova OP, Kopilov PV. Current epidemiological aspects of norovirus infection. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii*. 2021;40(40):72–78. (In Russ.)
9. Хохлова Н.И., Капустин Д.В., Краснова Е.И., Извекова И.Я. Норовирусная инфекция (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10. № 1. С. 5–14. doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-1-5-14
10. Khokhlova NI, Kapustin DV, Krasnova EI, Izvekov IYa. Norovirus infection (systematic review). *Zhurnal Infektologii*. 2018;10(1):5–14. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-1-5-14
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
12. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, *et al.* Scikit-learn: machine learning in Python. *J Mach Learn Res*. 2011;12(85):2825–2830.
13. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, *et al.* Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol*. 2019;100(10):1393–1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318
14. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, *et al.* 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
15. Сапега Е.Ю., Бутакова Л.В., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Курганова О.П., Копылов П.В. Заболеваемость острыми кишечными инфекциями, вызванными вирусными возбудителями, в субъектах Дальневосточного федерального округа //

- Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2021. Т. 41. № 41. С. 36–43.
12. Sapega EYu, Butakova LV, Trotsenko OE, Zaitseva TA, Kurganova OP, Kopilov PV. Acute gastrointestinal infections caused by viral pathogens in constituent entities of the Far Eastern Federal District. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii*. 2021;41(41):36–43. (In Russ.)
 13. Iritani N, Yamamoto SP, Abe N, *et al.* GII.17 norovirus infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan during two decades. *J Med Virol*. 2019;91(12):2101–2107. doi: 10.1002/jmv.25560
 14. Kim H, Won YJ, Kang LH, *et al.* Complete sequence analysis of human norovirus GII.17 detected in South Korea. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e203. doi: 10.1017/S0950268819000943
 15. LeBlanc JJ, Pettipas J, Gaston D, *et al.* Outbreak of norovirus GII.P17–GII.17 in the Canadian Province of Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2016;2016:1280247. doi: 10.1155/2016/1280247
 16. Giammanco GM, De Grazia S, Bonura F, *et al.* Norovirus GII.17 as major epidemic strain in Italy, winter 2015–16. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(7):1206–1208. doi: 10.3201/eid2307.161255
 17. Makhaola K, Moyo S, Lechiile K, Goldfarb DM, Kebaabetswe LP. Genetic and epidemiological analysis of norovirus from children with gastroenteritis in Botswana, 2013–2015. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):246. doi: 10.1186/s12879-018-3157-y
 18. Gelaw A, Pietsch C, Mann P, Liebert UG. Molecular detection and characterisation of sapoviruses and noroviruses in outpatient children with diarrhoea in Northwest Ethiopia. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e218. doi: 10.1017/S0950268819001031
 19. Lee S, Jang J, Bae K, Lee W, Chung H, Park S. Prevalence of human Norovirus by genotype in contaminated groundwater in Korea over the last decade (2007–2016). *J Microbiol*. 2018;56(12):926–931. doi: 10.1007/s12275-018-8340-8
 20. Mabasa VV, Meno KD, Taylor MB, Mans J. Environmental surveillance for noroviruses in selected South African wastewaters 2015–2016: Emergence of the novel GII.17. *Food Environ Virol*. 2018;10(1):16–28. doi: 10.1007/s12560-017-9316-2
 21. Hasing ME, Lee BE, Qiu Y, *et al.* Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012–2018. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):177. doi: 10.1186/s12879-019-3792-y
 22. Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Каравянская Т.Н., Лебедева Л.А. Водная вспышка острой кишечной инфекции, обусловленная рекомбинантным норовирусом генотипа GII.P7–GII.6, в городе Хабаровске в 2019 году // Здоровье населения и среда обитания. 2020. № 6 (327). С. 50–54. doi: 10.35627/2219-5238/2020-327-6-50-54
 23. Butakova LV, Sapega EYu, Trotsenko OE, Zaitseva TA, Karavyanskaya TN, Lebedeva LA. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis caused by recombinant norovirus GII.P7–GII.6 in Khabarovsk in 2019. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2020;(6(327)):50–54. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2020-327-6-50-54
 24. Fumian TM, Ferreira FC, de Andrade JDSR, *et al.* Norovirus foodborne outbreak associated with the consumption of ice pop, Southern Brazil, 2020. *Food Environ Virol*. 2021;13(4):553–559. doi: 10.1007/s12560-021-09495-9
 25. Zhou X, Kong DG, Li J, *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with GII.17 norovirus-contaminated secondary water supply system in Wuhan, China, 2017. *Food Environ Virol*. 2019;11(2):126–137. doi: 10.1007/s12560-019-09371-7
 26. Sang S, Yang X. Evolutionary dynamics of GII.17 norovirus. *PeerJ*. 2018;6:e4333. doi: 10.7717/peerj.4333
 27. Chen C, Wu B, Zhang H, *et al.* Molecular evolution of GII.P17–GII.17 norovirus associated with sporadic acute gastroenteritis cases during 2013–2018 in Zhoushan Islands, China. *Virus Genes*. 2020;56(3):279–287. doi: 10.1007/s11262-020-01744-6

