На правах рукописи

Сашина Татьяна Александровна

Молекулярная характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Нижнем Новгороде

03.02.02 - Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник здравоохранения **Новикова Надежда Алексеевна**

Официальные оппоненты:

Подколзин Александр Тихонович – доктор медицинских наук, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций

Альховский Сергей Владимирович – доктор биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, заведующий лабораторией биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «28» июня 2018 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, http://www.instmech.ru

Автореферат разослан «___»_____2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук И. В. Яковлева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ротавирусы группы А (сем. *Reoviridae,* п/сем. *Sedoreovirinae*, род *Rotavirus,* РВА) являются этиологическим агентом острого гастроэнтерита у детей младшего возраста. Ротавирусы – высококонтагиозный агент, который к пяти годам поражает до 95% всех невакцинированных детей в мире (Parashar U. D. et al., 2006, Widdowson M. A. et al., 2009). По оценкам, в довакцинальный период (1986-2000 гг.) ротавирусы были причиной 111 миллионов случаев гастроэнтерита, 2-х миллионов госпитализаций в мире и 453 тысяч смертей в развивающихся странах ежегодно (Ogilvie I. et al., 2011, Tate J. E. et al., 2011). Это послужило основанием для разработки ротавирусных вакцин и программ вакцинации, показавших высокую эффективность и позволивших снизить бремя ротавирусной инфекции в мире (Yen C. et al., 2011, Tate J. E. et al., 2011).

В России в 2000–2013 гг. показатель заболеваемости ротавирусным гастроэнтеритом (РВГЭ) увеличился в 7,8 раз (Черепанова Е. А. и др., 2015). В 2014 году в российский календарь прививок по эпидемическим показаниям была введена ротавирусная вакцина RotaTeq. Она имеет в своем составе компоненты генотипов G1, G2, G3, G4 и P[8], и ее широкое применение может повлиять на эволюцию ротавирусов (Heaton P. M., Ciarlet M., 2007, Bucardo F. et al., 2015). Объемы вакцинации в России еще не оказывают существенного воздействия на проявления эпидемического процесса, что определяет актуальность изучения ротавирусов на рубеже довакцинального и вакцинального периодов.

Ротавирусы характеризуются широким антигенным разнообразием, обусловленным наличием в составе наружного капсида вириона двух белков (протеазочувствительного VP4, P-серотип, и гликопротеина VP7, G-серотип). Они несут на своей поверхности антигенные эпитопы и являются мишенями нейтрализующих вирус антител. На основе особенностей первичной структуры генов, кодирующих VP7 и VP4, разработана бинарная классификация ротавирусов, включающая определение G- и P-генотипа, соответственно (M. K. Estes, A .Z. Kapikian, 2007). К настоящему времени идентифицировано 35 G- и 50 P-генотипов ротавируса, из которых не менее 12 G-, 15 P-типов и более 70 их комбинаций обнаружены у людей (Maes P. et al., 2009, Banyai K. et al., 2012).

Штаммы ротавируса человека, имеющие комбинации генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] распространены повсеместно, в том числе и в Российской Федерации (Gentsch J. R. et al., 2005, Santos N., Hoshino Y., 2005, Podkolsin A. T. et al., 2009, Подколзин А. Т. и др., 2013, Veselova O. A. et al., 2014, Новикова Н. А. и др., 2007, Жираковская Е. В. и др., 2012). Распределение генотипов имеет свои региональные особенности, доминирующие на определенной территории генотипы меняются с течением времени, на разных территориях могут преобладать ротавирусы разных генотипов, что показывает необходимость изучения локальных ротавирусных популяций (Kirkwood C. D., 2010, Patton J.T., 2012, Новикова Н.А. и др., 1998, Новикова Н.А. и др., 2007).

В ряде стран, где в национальный календарь прививок были включены ротавирусные вакцины, произошло резкое перераспределение доминирующих генотипов (Kirkwood C. D. et al, 2011, Hull J. T. et al., 2011, Pietsch C., 2011). Остается неясным, связано ли это с введением вакцинации или с естественными циклами циркуляции ротавирусов. В связи с этим, разные авторы подчеркивают необходимость мониторинга циркулирующих вариантов ротавируса до и после начала применения вакцин с целью изучения их влияния на структуру ротавирусной популяции (Zeller M. et al., 2011, Zeller M. et al., 2015, Kirkwood C. D., 2010, Patton J. T., 2012).

Таким образом, исследование ротавирусов, циркулирующих в разных регионах России без вакцинного давления, является актуальным и представляет научно-практический интерес. Данная работа посвящена изучению разнообразия вариантов ротавируса в Нижнем Новгороде с использованием дополняющих друг друга подходов: G- и P-генотипирования методом ОТ-ПЦР, секвенирования генов VP4 и VP7, филогенетического анализа и исследования выведенной аминокислотной последовательности белков наружного капсида.

Степень разработанности проблемы. К настоящему времени накоплены обширные знания о строении вириона ротавируса, функциях его структурных и неструктурных белков, жизненном цикле, иммунитете к ротавирусам у людей (M. K. Estes, A. Z. Kapikian, 2007). Были разработаны бинарная и полногеномная классификации ротавирусов группы А, инфицирующих людей и животных (Gentsch J. R. et al., 2005, Matthijnssens et al., 2008). Получены нуклеотидные последовательности полных геномов многих штаммов ротавируса, в том числе референтных (Matthijnssens et al., 2008). В литературе представлены работы, посвящённые исследованию многолетней циркуляции ротавирусов в разных странах (Arista S. et al., 2006, Barril P. et al., 2013, Wang Y.H. et al., 2014).

Для территории России опубликованы данные о распространенности генотипов ротавируса группы А в одиннадцати регионах (Московская, Томская, Нижегородская, Иркутская, Свердловская, Новосибирская, Оренбургская области, Республика Дагестан, Хабаровский край, Камчатский край, Ненецкий АО) в 2011-2012 гг. (Жираковская Е. В. и др., 2012, Veselova O. A. et al., 2014, Бахтояров Г. Н. и др., 2014, Денисюк Н. Б., Паньков А. С, 2016). В Новосибирске и Омске на основании филогенетического анализа детально охарактеризовано разнообразие геновариантов ротавирусов, циркулирующих среди детей (Жираковская Е. В. и др., 2012).

В Нижнем Новгороде изучение разнообразия типов и геновариантов циркулирующих ротавирусов с помощью молекулярно-генетических методов проводится, начиная с 1984 года. Были показаны колебания доли разных типов и постепенная смена доминирующих вариантов в период 1984-2004 гг. (Новикова Н.А. и др., 1998, Новикова Н.А. и др., 2007). Настоящая работа является логическим продолжением проведенных исследований и содержит сведения, дополняющие и расширяющие имеющиеся знания о генетической структуре и вариантах ротавируса А в регионах Российской Федерации.

Целью работы явилась молекулярная характеристика и филогенетический анализ ротавирусов группы А, циркулировавших в Нижнем Новгороде.

Для достижения цели были поставлены **задачи**:

1. Оптимизировать методику мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией результата для определения G- и P-генотипов ротавируса А.
2. Определить спектр и долевое распределение G[P]-типов ротавируса А, циркулировавшего в Нижнем Новгороде в период 2005-2016 гг.
3. Установить нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК генов VP7 и VP4 современных и коллекционных изолятов ротавируса, собранных в период 1984-2016 гг.
4. Изучить разнообразие вариантов ротавируса внутри генотипа P[8] с использованием филогенетического анализа на основе гена VP4 и анализа аминокислотной последовательности домена VP8* белка VP4.
5. Изучить разнообразие вариантов ротавируса внутри G-генотипов, ассоциированных с генотипом P[8], с использованием филогенетического анализа на основе гена VP7 и анализа аминокислотной последовательности белка VP7.

Научная новизна работы:

1. Оптимизирована методика мультиплексной ПЦР для идентификации генотипов ротавируса А. Определен спектр и долевое распределение G[P]-типов в Нижнем Новгороде в ранее не охарактеризованный период 2005-2016 гг. Спектр включал 11 генотипов ротавируса с доминированием генотипа G4P[8] (57,2 %). Впервые в Нижнем Новгороде и в России идентифицированы генотипы G1P[9], G3P[6], G4P[9], G6P[9] и G9P[9]. В сезон 2015-2016 гг. установлено доминирование ротавирусов генотипа G9P[8] (44,4 %) в Нижнем Новгороде, что является первым свидетельством о доминировании данного генотипа в одном из городов Европейской части России.
2. Разработана новая методика амплификации перекрывающихся фрагментов гена VP7, с использованием которой определены нуклеотидные последовательности участка гена длиной 888 п. н. 111-ти современных и коллекционных штаммов ротавируса. Получены 62 новые последовательности фрагмента VP8* гена VP4 и 111 новых последовательностей фрагмента гена VP7 ротавирусов, которые размещены в GenBank под номерами KM977712-KM977732, KM288556-KM288567, KR827525-KR827531, KR827512-KR827524, KT600325-KT600363, KX545299-KX545327, KY807549-KY807556, что расширило информацию о нуклеотидных последовательностях российских штаммов ротавируса человека в международной базе.
3. Впервые проведен филогенетический анализ российских ротавирусов на основе генов VP4 и VP7 с использованием Баесовского подхода. Показано генетическое разнообразие российских штаммов внутри линии P[8]-3, заключающееся в наличии представителей 5 сублиний. Выделена ранее не

охарактеризованная сублиния P[8]-3.7, сформированная российскими изолятами сезона 2006-2007 гг.

4. Впервые на основе анализа генов VP4 и VP7 охарактеризованы общероссийские и выделены новые варианты ротавируса, относящиеся к разным филогенетическим сублиниям и имеющие замены аминокислот в антигенных эпитопах белков VP4 и VP7 (G1-II/94N/123S/217M−P[8]-3, G3-3-e/87S−P[9], G3-3-a/190S−P[8]-3.6, G4-Ic/76N−P[8]-3.6, G9-III-d/70L−P[8]-3.6/194D) и G1-I/94S/123N/217T−P[8]-3.1/113D, G3-3-a/190F−P[8]-3.6, G9-III-d/65A/139I−P[8]-3.6/191T/194D, соответственно).

5. Впервые дана молекулярная характеристика ротавирусов, собранных на протяжении 32-х летнего периода (1984-2016 гг.), что позволило проследить смену вариантов ротавируса внутри генотипов P[8], G1 и G9 и стабильность вариантов генотипов G3 и G4 в Нижнем Новгороде.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты генотипирования и филогенетического анализа ротавирусов могут быть использованы в качестве базы для теоретической оценки влияния ротавирусных вакцин на генетическую структуру популяции ротавируса в Нижнем Новгороде и в России.

Установленные соискателем новые нуклеотидные последовательности генома российских ротавирусов группы А дополняют информацию международной базы данных и могут быть использованы для сравнительного анализа штаммов ротавируса, выявленных в разных регионах России и в других странах для установления их филогенетических взаимоотношений.

Полученная автором работы молекулярная характеристика, включающая филогенетический анализ и анализ антигенных эпитопов основных протективных антигенов ротавирусов (VP7, VP4), собранных на одной территории на протяжении длительного периода времени (32 года), имеет значение для понимания естественной эволюции ротавирусов разных типов.

Результаты исследований на ротавирусы направлялись в Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области, где использовались в определении доли ОКИ установленной этиологии (Акт внедрения от 17.10.17) и вошли в Государственные доклады «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Нижегородской области» в 2009-2011 гг., «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Нижегородской области» в 2013-2015 гг., «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2010 году» и «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» в 2015-2016 гг.

Научные результаты, полученные в ходе выполнения работы, используются при подготовке магистров и аспирантов, обучающихся по специальности биология в ФГАОУ ВО ННГУ им. Н.И. Лобачевского, и при чтении лекций на курсах повышения квалификации в ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России.

Методология и методы исследования. Работа была проведена с использованием молекулярно-генетических методов исследования и включала определение генотипа ротавирусов с использованием мультиплексной ПЦР, секвенирование по Сэнгеру фрагментов кДНК двух генов отобранных современных изолятов и коллекционных РНК ротавируса, филогенетический анализ с использованием Байесовского подхода, а также исследование выведенных аминокислотных последовательностей белков наружного капсида вириона. Полученные данные о молекулярной структуре были сопоставлены с полученными ранее результатами генотипирования и мониторинга циркулировавших вариантов для детальной характеристики нижегородской популяции ротавирусов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в 2005-2016 гг. включал не менее 11 генотипов, представленных доминирующими (G1P[8], G4P[8], G9P[8]) и минорными (G1P[9], G2P[4], G3P[8], G3P[6], G3P[9], G4P[9], G6P[9], и G9P[9]). Доминирующие генотипы сменяли друг друга в изучаемый период: в 2005-2007 гг. преобладали ротавирусы генотипа G1P[8], в 2007 – 2015 гг. – G4P[8], в 2015 − 2016 гг. – G9P[8].
2. Нижегородские ротавирусы генотипа P[8] относились к двум филогенетическим линиям и пяти сублиниям линии P[8]-3 и имели отличия в структуре антигенных эпитопов белка VP4.
3. Нижегородские РВА G-генотипов, ассоциированных с P[8], представлены длительно присутствовавшими в популяции, антигенно и генетически стабильными вариантами генотипов G1, G3, G4 и вариантами генотипов G1, G3, G9 с новыми молекулярно-генетическими характеристиками.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность полученных результатов определяют значительный объем выборки образцов для обнаружения и генотипирования ротавирусов (лабораторным обследованием охвачено 12334 человека), применение статистических методов анализа данных, а также Байесовского подхода для филогенетических реконструкций и использование современного оборудования и реактивов в соответствии с рекомендациями производителей.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на XVII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 28-31 мая 2012 г.); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Новые научные достижения молодых ученых в эпидемиологии, клинике, диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней» (Москва, 28 ноября 2012 г.); XVIII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 28-31 мая 2013 г.); VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 24-26 марта 2014 г.); на конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г.); на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-

Петербург, 08-10 декабря 2015 г.); на Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Нижний Новгород, 25 мая 2016 г.); IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 27-29 марта 2017 г.); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20 апреля 2017 г.), Межрегиональной научно-практической конференции эпидемиологов Приволжского федерального округа «Эпидемиологическая безопасность медицинской помощи и противоэпидемическое обеспечение населения» (Нижний Новгород, 23 мая 2017 г.).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 20 печатных работ; пять статей и семь тезисов опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 166 листах печатного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, основной части работы, излагающей полученные результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающей 309 источников отечественных и зарубежных авторов, и приложения. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 10 таблицами.

Вклад автора в диссертационную работу. Основные результаты, представленные в диссертационной работе, получены автором лично. На разных этапах проведения исследования в работе приняли участие Н. В. Епифанова, О. В. Морозова, А. Ю. Кашников, С. Г. Фомина, В. В. Зверев, которым автор выражает искреннюю благодарность. Особую признательность автор выражает д.б.н., профессору Н. А. Новиковой за критические замечания, полезные советы и поддержку на всех этапах выполнения исследования и написания диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

При проведении работы было обследовано 12334 ребенка в возрасте до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода (Детская инфекционная больница №8) с симптомами ОКИ в 2005-2016 гг. Обследование детей на группу кишечных вирусов проходило с информированного согласия родителей на участие в исследовании.

Обнаружение РНК ротавирусов проводили с использованием коммерческих ПЦР тест-систем с электрофоретической и гибридизационно-флуоресцентной детекцией (АмплиСенс Rotavirus-EPh и АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL, Центральный Научно-Исследовательский Институт Эпидемиологии (ЦНИИЭ), Россия) и иммунохроматографической тест-системы (Рота/Адено КомбиСтик, NOVAmed, Израиль). Параллельно РНК ротавирусов выявляли методом электрофореза в полиакриламидном геле (РНК-ПААГ).

Определение G[P]-генотипа 3653-х выявленных ротавирусов осуществляли с использованием мультиплексной ПЦР с детекцией результата в агарозном геле. Для изучения методом секвенирование были взяты 91 современный и 47 архивных образцов из коллекции РНК ротавирусов.

Секвенирование кДНК фрагментов генов VP4 и VP7 проводили по двум цепям с использованием специфичных праймеров, набора для постановки реакции секвенирования DTCS Quick Start Kit и системы генетического анализа Beckman Coulter CEQ 8000 (Beckman Coulter, США). Были определены нуклеотидные последовательности 173 фрагментов кДНК генома ротавирусов.

В работе для анализа региона посадки типоспецифических праймеров и филогенетических реконструкций была использована 951 нуклеотидная последовательность генов VP7 и VP4 ротавирусов, доступная в GenBank.

Для расчета температуры плавления олигонуклеотидов применяли программу OligoCalc (Kibbe W. A. et al., 2007). Поиск родственных последовательностей осуществляли с использованием онлайн-сервиса BLAST (Altschul S. F. et al, 1990). Выравнивание и анализ нуклеотидных и выведенных аминокислотных последовательностей генов и белков VP4 и VP7, проводили с помощью программы MEGA 6.0 (Tamura K. et al., 2013). Выборки нуклеотидных последовательностей далее анализировали с помощью программ BEAUti 1.8.2 и BEAST 1.8.2 (Drummond A. J., 2012). Филогенетические деревья на основе полученных данных строили в программе TreeAnnotator 1.8.2 и визуализировали их в программе FigTree 1.4.2.

Результаты и их обсуждение

1 Идентификация G[P]-типа ротавирусов группы А, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2005-2016 гг.

На первом этапе работы была проведена проверка соответствия общих и типоспецифических праймеров, опубликованных в 2007 году, нуклеотидным последовательностям генов VP4 и VP7 современных штаммов ротавируса. Выравнивание 265 нуклеотидных последовательностей гена VP7 и 158 нуклеотидных последовательностей гена VP4 ротавирусов разных генотипов, циркулировавших в 2003-2012 гг. в 30 странах, позволило выявить вариабельность в регионах посадки праймеров. Модификаци праймеров для определения G- и P-генотипа включали введение вырожденных оснований, добавление концевых нуклеотидов для повышения температуры плавления, смещение региона посадки и подбор нового региона посадки праймера для определения генотипа P[9] (н.о. 190-210). Эмпирически были подобраны оптимальные для постановки мультиплексной ПЦР параметры температуры отжига: 57º С - для праймеров 9F, G1R, G2R и G4R, 55º - С для праймеров 9F, G3R и G9R, 55º С - для праймеров Con3, P[4]R, P[6]R, P[8]R и P[9]R.

С использованием оптимизированной ПЦР проведено определение G- и P-типа в 3010 изолятах ротавируса, выявленных в 2005-2016 гг. (Рисунок 1 А).

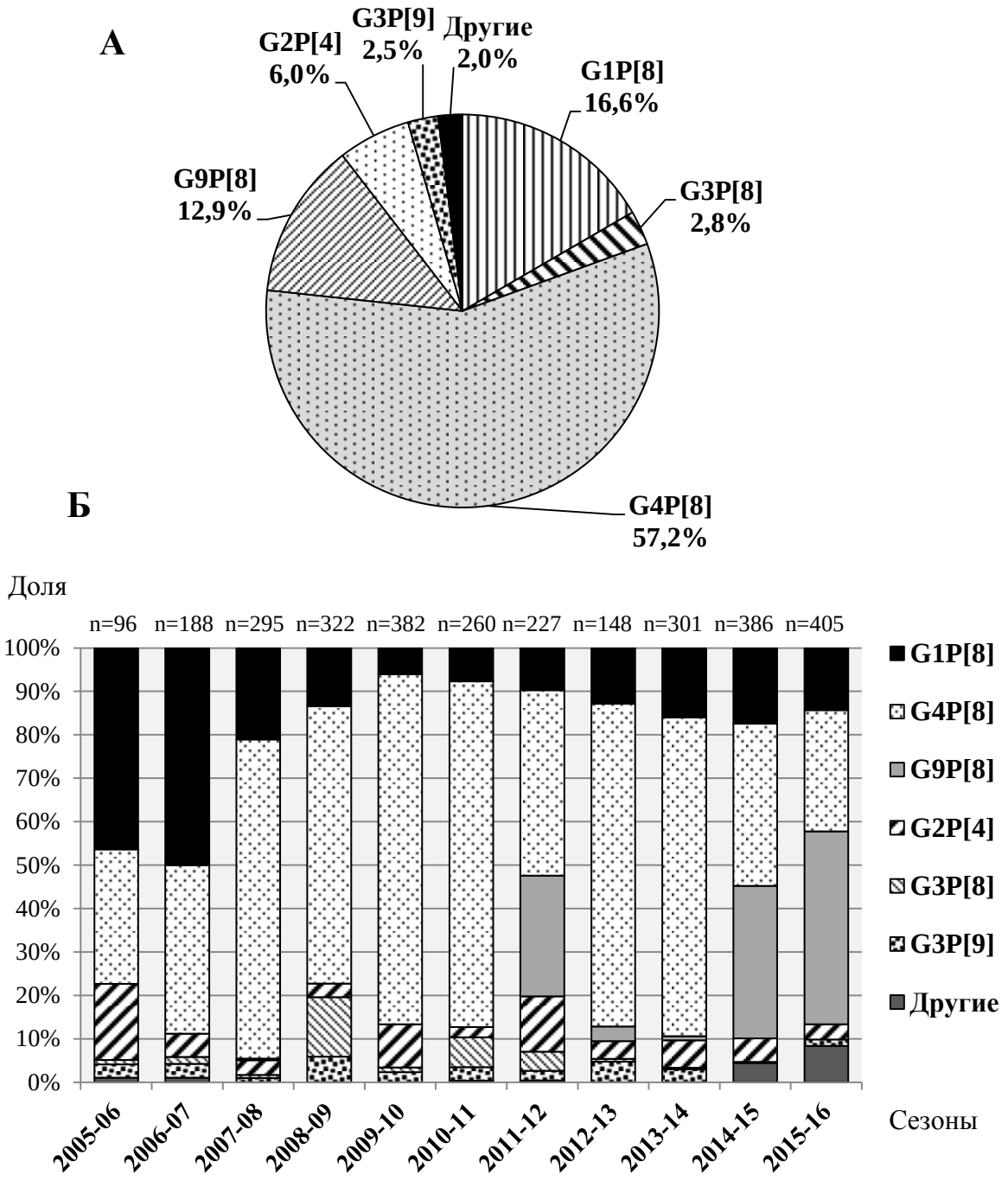

Рисунок 1. Генотипы ротавирусов, выявленных в Нижнем Новгороде в 2005-2016 гг. А – долевое распределение ротавирусов по генотипам за весь изучаемый период. Б – распределение основных типов ротавируса в разные сезоны.

Спектр идентифицированных G-генотипов ротавируса включал 5 широко распространенных в мире (G1, G2, G3, G4 и G9). Кроме того, методом секвенирования был обнаружен один редкий генотип (G6). Спектр P-генотипов ротавирусов включал 4 типа, среди которых были как широко распространенные в мире P[4] и P[8], так и редкие P[6] и P[9]. G- и P-генотипы были выявлены в 11 комбинациях: G1P[8], G1P[9], G2P[4], G3P[8], G3P[6], G3P[9], G4P[8], G4P[9], G6P[9], G9P[8] и G9P[9]. Генотипы G1P[9], G3P[6],

G4P[9], G6P[9] и G9P[9] были идентифицированы нами в Нижнем Новгороде и России впервые.

В изучаемый период в нижегородской популяции РВА доминировали штаммы, имеющие генотип G4P[8] (57,2 %). На втором месте были ротавирусы генотипа G1P[8] (16,6 %). Доля РВА генотипа G9P[8] составила 12,9 %, других генотипов в сумме – 13,3 %.При изучении многолетней динамики циркуляции ротавирусов показано временное перераспределение доминирующих типов: в 2005 - 2007 гг. преобладали ротавирусы типа G1P[8], в сезоны 2007-2015 гг. – типа G4P[8], начиная с 2015 г. - типа G9P[8] (Рисунок 2 Б).

Ротавирусы типов G2P[4], G3P[8] и G3P[9] постоянно присутствовали в популяции в изучаемый период времени, однако, их вклад превышал 10 % лишь в отдельные сезоны. Так, штаммы генотипа G2P[4] составили 16,7 %, и 12,8 % случаев в 2005-2006 гг. и 2011-2012 гг., соответственно. В сезон 2008-2009 гг. наблюдалось повышение доли ротавирусов генотипа G3P[8] до 13,7 %. Штаммы, имеющие генотипы G3P[6], G6P[9], G1P[9], G4P[9] и G9P[9], выявлены в Нижнем Новгороде в единичных случаях (сезоны 2006-2007 гг., 2010-2011 гг., 2011-2012 гг. и 2014-2015 гг.).

2 Молекулярно-генетическая характеристика ротавирусов генотипа P[8] на основе гена VP4

В ходе изучения разнообразия ротавирусов внутри генотипа P[8] нами были получены 62 нуклеотидные последовательности фрагмента VP8* гена VP4 размером 877 п.н. Исследуемые изоляты ротавируса были собраны в Нижнем Новгороде в разные сезоны на протяжении 32-летнего периода (1984-2016 гг.) и имели разные G-генотипы. На основе полученных в данной работе и 52 взятых из GenBank последовательностей гена VP4 ротавирусов из семи городов России (Москва, Смоленск, Новосибирск, Омск, Владивосток, Ханты-Мансийск и Красноярск) и десяти стран мира с применением Байесовского метода было построено филогенетическое дерево, представленное на рисунке 2 А.

Филогенетический анализ выявил наличие на территории России представителей линий P[8]-1, P[8]-3 и P[8]-4, согласно классификации S. Arista et al. (2005). На примере нижегородской популяции показана постепенная полная замена аллеля P[8]-1 аллелем P[8]-3 у ротавирусов в течение 19 лет (Рисунок 2 Б). Линия P[8]-1 после 2004 года не обнаружена. По рассчетам, общий предок представителей линии P[8]-3 циркулировал около 32 лет назад – в 1984 году (95 % HPD 1975-1989 гг.). Ротавирусы линий P[8]-2 и P[8]-4 на территории Нижнего Новгорода не идентифицированы.

В 2005 - 2016 гг. была выявлена вариабельность нуклеотидной последовательности гена VP4 российских ротавирусов линии P[8]-3, проявившаяся в их принадлежности к трем сублиниям P[8]-3 (P[8]-3.1, P[8]-3.3 и P[8]-3.6), согласно M. F. M. da Silva et al. (2013), и не охарактеризованной ими сублинии, обозначенной нами P[8]-3.7.

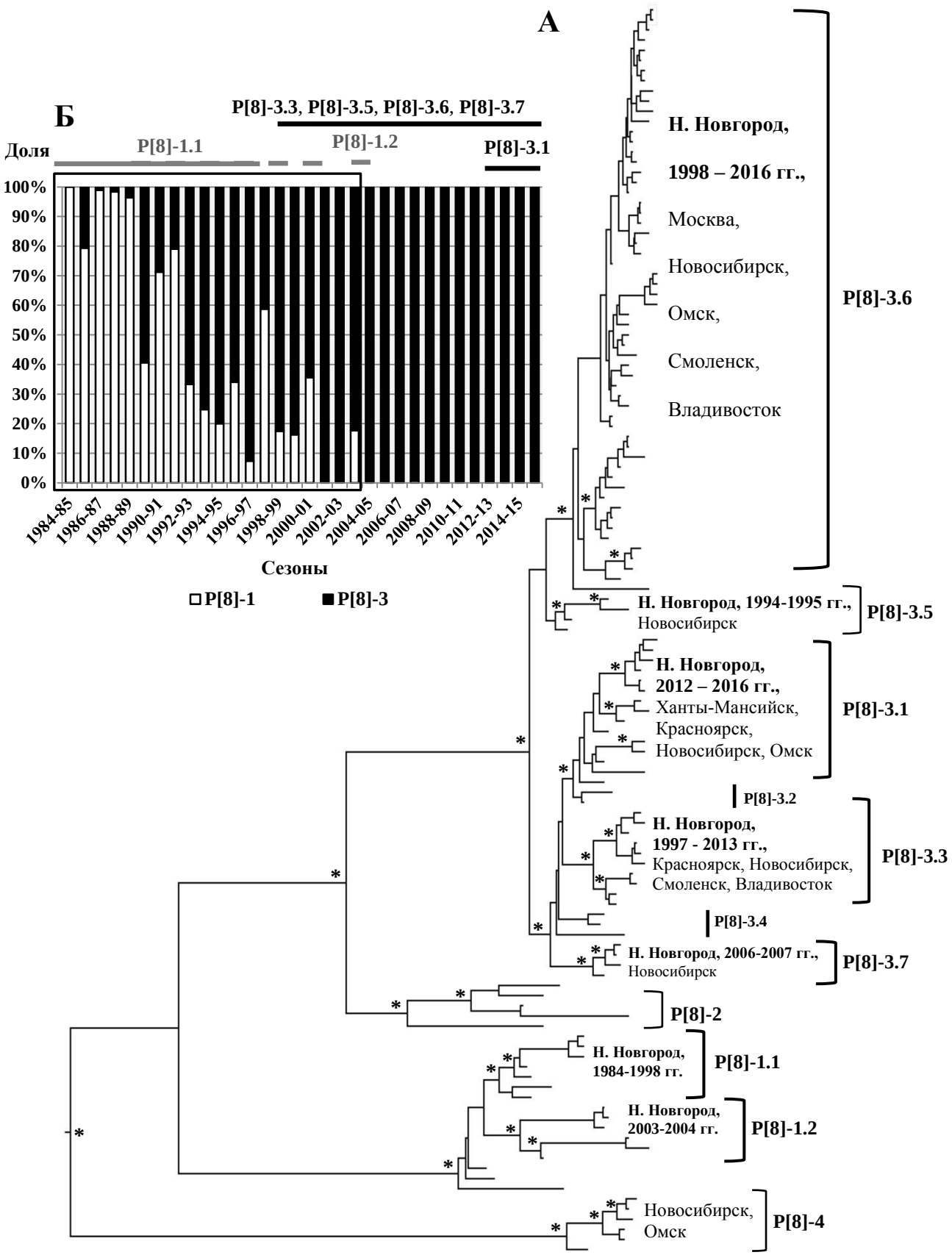

Рисунок 2. А − Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP4 российских изолятов ротавируса. Узлы дерева со значением апостериорной вероятности более 95% отмечены звездочкой. **Б − Смена аллеля P[8]-1 гена VP4 аллелем P[8]-3 в популяции ротавирусов Нижнего Новгорода.** Рамкой выделен период, ранее охарактеризованный Н. А. Новиковой и О. Ф. Федоровой.

Ближайшие предки разных сублиний циркулировали в период 1990–1999 гг. К 2016 году уровень различия нуклеотидных последовательностей гена VP4 российских штаммов разных сублиний достиг 5,6 %.

Домен VP8*, представляющий собой головку шипа вириона, является мишенью нейтрализующих вирус антител и несет на своей поверхности антигенные эпитопы. Замена аминокислоты в данных регионах теоретически может быть причиной конформационных изменений полипептидной цепи и оказать влияние на антигенные свойства белка.

На основании анализа аминокислотной последовательности антигенных эпитопов в изучаемый период нами было выделено семь вариантов российских ротавирусов разных сублиний линии P[8]-3 в зависимости от наличия замен в позициях 113, 189, 191 и 194 (P[8]-3.1/113D, P[8]-3.3/113D, P[8]-3.6 без замен, P[8]-3.6/189T, P[8]-3.6/194D, P[8]-3.6/191T/194D и P[8]-3.7/113D). Из них в Нижнем Новгороде к сезону 2015−2016 гг. остались только два (P[8]-3.1/113D и P[8]-3.6/191T/194D). Вариант белка P[8]-3.1/113D был обнаружен преимущественно у штаммов генотипа G1, в то время как P[8]-3.6/191T/194D в основном присутствовал у доминирующих ротавирусов генотипов G4 и G9.

На поверхности домена VP8* находится сайт, распознающий рецепторы на мембране энтероцитов. X. Yu et al. (2015) было показано, что при взаимодействии с ними регион I192–S197 претерпевает конформационные изменения. У штаммов сублинии P[8]-3.6 замены A191T и N194D располагаются в этой области. Возможно, именно они позволили варианту P[8]-3.6/191T/194D получить преимущество на этапе адсорбции вириона на поверхности клетки-мишени и способствовали его широкому распространению в Нижнем Новгороде и в России.

3 Молекулярно-генетическая характеристика ротавирусов на основе гена VP7

Характеристика ротавирусов генотипа G1. В данной работе была разработана методика амплификации перекрывающихся фрагментов гена VP7 для получения нуклеотидной последовательности участка длиной 888 п. н., с целью построения филогенетического дерева с достаточным значением апостериорной вероятности узлов. С использованием этой методики были получены нуклеотидные последовательности гена VP7 46 нижегородских изолятов ротавируса генотипа G1P[8]. На основе 125 последовательностей гена VP7 из Нижнего Новгорода, Москвы, Смоленска, Новосибирска, Омска и Красноярска, а также из других стран, было построено филогенетическое дерево (Рисунок 3 А).

На территории Российской Федерации были идентифицированы ротавирусы двух филогенетических линий (I и II) и шести сублиний (I-A, I-B, I-D, II-B, II-C и II-E), согласно T. G. Phan et al. (2007). Штаммы ротавируса, выявленные в Нижнем Новгороде до 2000 года, входили в состав только одной линии (сублиния II-E), в то время как после 2000 года коциркулировали представители обеих линий (сублинии I-A, I-D, II-B и II-C).

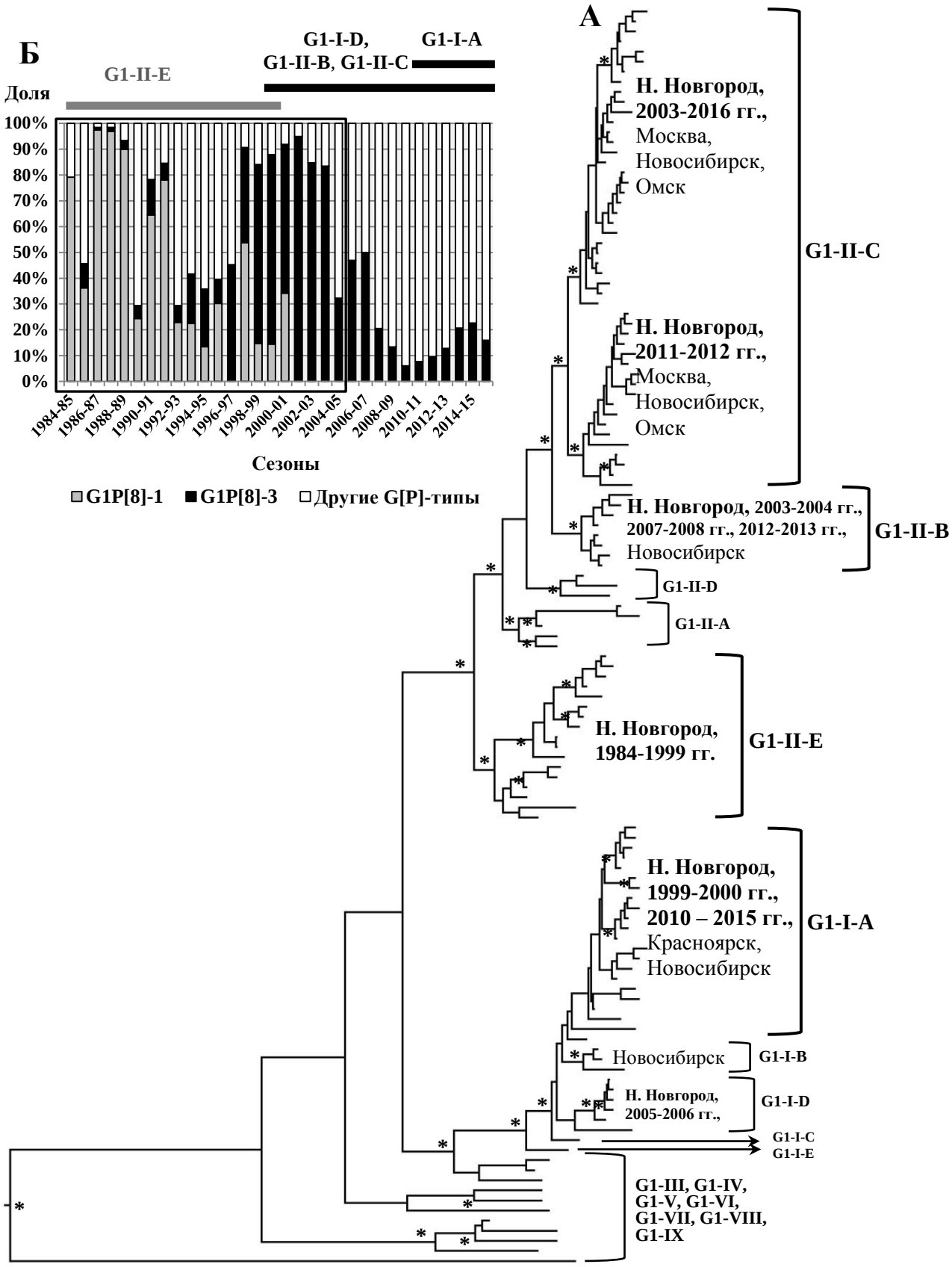

Рисунок 3. А – Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP7 российских ротавирусов генотипа G1P[8]. Узлы дерева со значением апостериорной вероятности более 95% отмечены звездочкой. **Б – Долевой вклад генотипа G1P[8] в типовую структуру нижегородской популяции ротавирусов в 1984-2016 гг.** Рамкой выделен период, ранее охарактеризованный Н. А. Новиковой и О. Ф. Федоровой.

Белок VP7 является основным компонентом наружного капсида вириона, главным индуктором нейтрализующих вирус антител и также имеет на своей поверхности антигенные эпитопы. У ротавирусов филогенетических линий I и II выявлены три отличия в позициях 94, 123 и 217 первичной структуры антигенного региона 7-1. Как показано B. S. Coulson и C. Kirkwood в 1991 году, варианты вируса с заменой аспарагина (N) на серин (S) или треонин (T) в позиции 94 не взаимодействовали с нейтрализующими антителами, следовательно, эта область важна для распознавания ими белка VP7. Данная замена присутствует у всех изолятов линии G1-I в сравнении с представителями линии G1-II, что подчеркивает их антигенные различия.

В Нижнем Новгороде в период доминирования ротавирусов генотипа G1 (1984–2005 гг.) показан эпидемический вариант G1-II-E-P[8]-1.1, присутствовавший до 2000 года (Рисунок 3 Б). После 2000 года было выявлено несколько аллелей гена VP7, среди которых преобладал G1-II-C в сочетании с аллелями P[8]-3.3 и P[8]-3.6 гена VP4.

В период 2005-2016 гг. в Нижнем Новгороде наблюдалась низкая активность циркуляции ротавирусов G1P[8] (в среднем 16,6 %, 6,0–50,0 %). Их присутствие в популяции поддерживалось за счет разнообразия аллелей генов VP4 (P[8]-3.1, P[8]-3.3, P[8]-3.6 и P[8]-3.7) и VP7 (G1-I-A, G1-I-D, G1-II-B и G1-II-C). В 2013-2016 гг. возросла роль нового варианта с характеристиками G1-I/94S/123N/217T−P[8]-3.1/113D, имеющего замены аминокислот в антигенных эпитопах белков VP4 и VP7. Представляется вероятным, что появление и распространение штаммов ротавируса генотипа G1P[8], несущих новые аллели генов VP7 и VP4, может способствовать преодолению ротавирусов генотипа G1 иммунологического прессинга, создаваемого естественным и искусственным иммунитетом.

Характеристика ротавирусов генотипа G3. В Нижнем Новгороде наблюдалась низкая активность циркуляции ротавирусов генотипа G3, который был показан в комбинации с генотипами P[6], P[8] и P[9]. Для изучения молекулярно-генетических особенностей ротавирусов данного генотипа были получены нуклеотидные последовательности гена VP7 штаммов, выявленных в период 1991-2014 гг. В анализ были взяты последовательности гена VP7 22-х нижегородских изолятов генотипа G3P[8] и 9-ти изолятов генотипа G3P[9], а также 81-го штамма ротавируса человека и животных из других городов России и 17 стран, размещенные в GenBank (Рисунок 4 А).

Российские ротавирусы генотипов G3P[8] и G3P[9] относились к двум разным филогенетическим сублиниям (3-а и 3-е), согласно классификации Y. H. Wang et al. (2014). Большинство ротавирусов типа G3P[8], выявленных в Нижнем Новгороде и других городах России в разные сезоны на протяжении периода 1991 – 2014 гг., характеризовались высоким сходством нуклеотидных и аминокислотных последовательностей VP7 (Рисунок 4 Б).

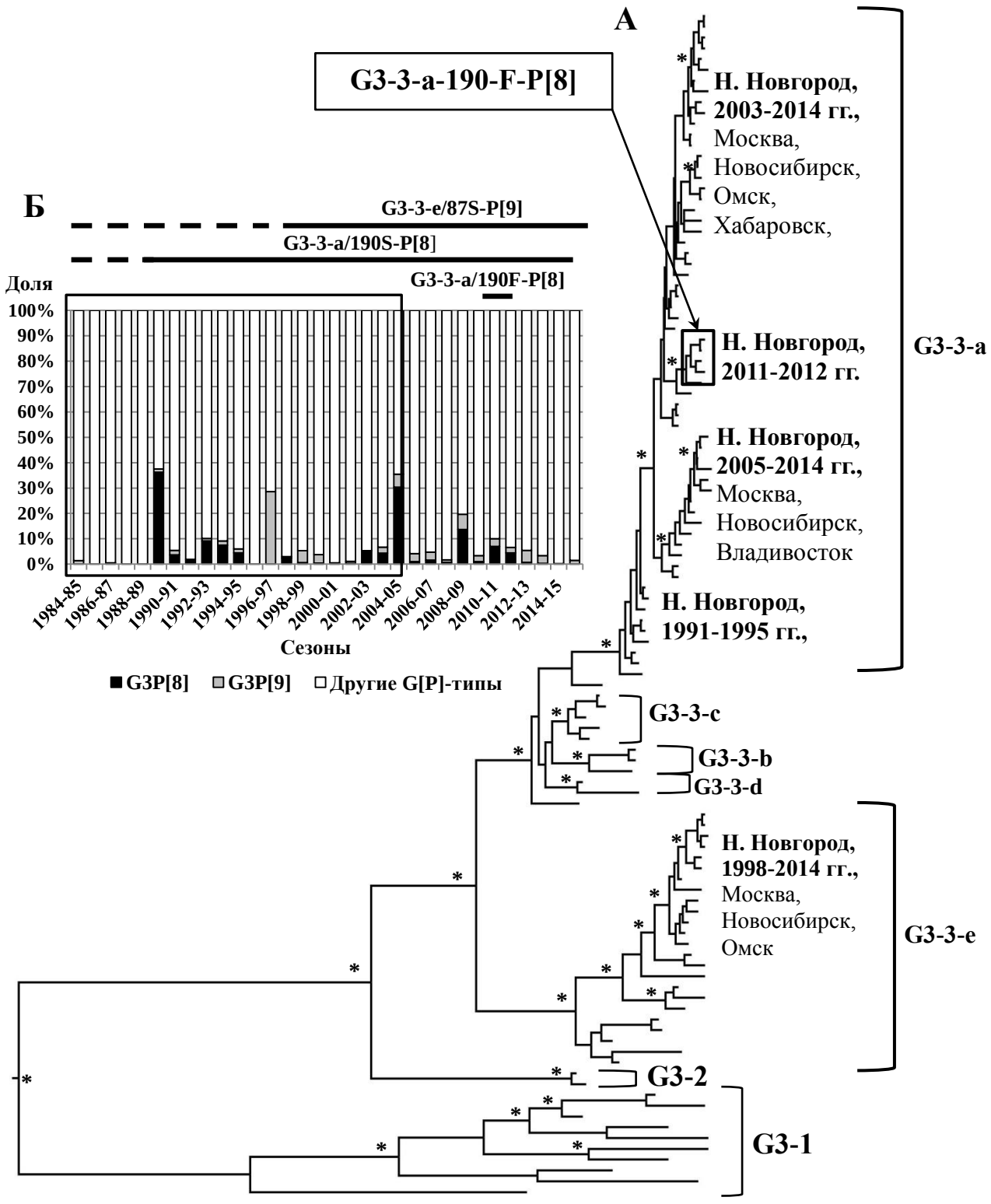

Рисунок 4. А - Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 нижегородских изолятов генотипа G3. Узлы дерева со значением апостериорной вероятности более 95% отмечены звездочкой. **Б - Долевой вклад генотипа G3 в типовую структуру нижегородской популяции ротавирусов в 1984-2016 гг.** Рамкой выделен период, ранее охарактеризованный Н. А. Новиковой и О. Ф. Федоровой.

Однако, пять нижегородских изолятов генотипа G3P[8] образовали в пределах сублинии 3-а отдельный достоверный кластер. Их отличие от других российских штаммов этой сублинии достигло 6,4 %. Изоляты были собраны в ноябре 2011г. – январе 2012 г. от детей в возрасте от 1 года 4 месяцев до 5 лет, проживающих в Заречной части Нижнего Новгорода. Данные изоляты имели замену серина на фенилаланин в позиции 190 в антигенном эпитопе 7-2 на поверхности белка VP7 (S190F) в сравнении с другими нижегородскими и российскими ротавирусами.

Ротавирусы генотипа G3P[9] в 1998 – 2013 гг. также были консервативны в первичной структуре гена и белка наружного капсида. Все они имели замену треонина на серин (T87S) в антигенном эпитопе 7-1а в сравнении со штаммами типа G3P[8].

Так, были выявлены стабильные на протяжении 1991 – 2014 гг. общероссийские варианты ротавируса, обозначенные G3-3-e/87S−P[9] и G3-3-a/190S−P[8]-3, а также новый вариант G3-3-a/190F−P[8]-3, не имеющий аналогов среди последовательностей, представленных в GenBank.

Характеристика ротавирусов генотипа G4. Для анализа генетических свойств доминирующих в нижегородской популяции ротавирусов типа G4P[8], нами были полученны нуклеотидные последовательности гена VP7 22-х изолятов, выявленных в 2006 – 2016 гг. При проведении филогенетического анализа также были использованы 54 последовательности штаммов данного генотипа, выделенные в пяти городах России и в 21 стране (Рисунок 5 А).

На филогенетическом дереве нуклеотидные последовательности гена VP7 российских ротавирусов вошли в состав кластеров, соответствующих линиям I и II, согласно K. Bok et al. (2002). Нижегородские изоляты относились к сублинии I-c. Ближайшими родственниками были штаммы из Москвы, Новосибирска, Омска, Италии, Бельгии, Греции, Японии, Бразилии и Парагвая. В настоящее время сублиния I-c является наиболее широко распространенной по всему миру.

Сходство нуклеотидных последовательностей гена VP7 нижегородских ротавирусов генотипа G4P[8] составило 98,2-100,0 %, что говорит о стабильности данного аллеля в 2005- 2016 гг. (Рисунок 5 Б).

Аминокислотная последовательность белка VP7 нижегородских ротавирусов типа G4P[8], в целом, была консервативна на протяжении 10 лет, процент сходства составил 98,0-100,0 %. Все штаммы несли инсерцию аспарагина в позиции 76 и глутаминовую кислоту, лизин и треонин в позициях 131, 144 и 146, характерные для представителей сублинии G4-I-c. В области конформационных антигенных эпитопов 7-1 и 7-2 временных изменений у нижегородских штаммов не обнаружено.

По данным научной литературы, появление ротавирусов сублинии G4-I-c произошло в 1998 году после сезонного подъема заболеваемости ротавирусной инфекцией в Аргентине (Bok K. et al., 2002). Разные авторы подчеркивают, что именно инсерция и замены в позициях 76, 131, 144 и 146, характерные для сублинии G4-I-c, могли способствовать поддержанию высокой активности

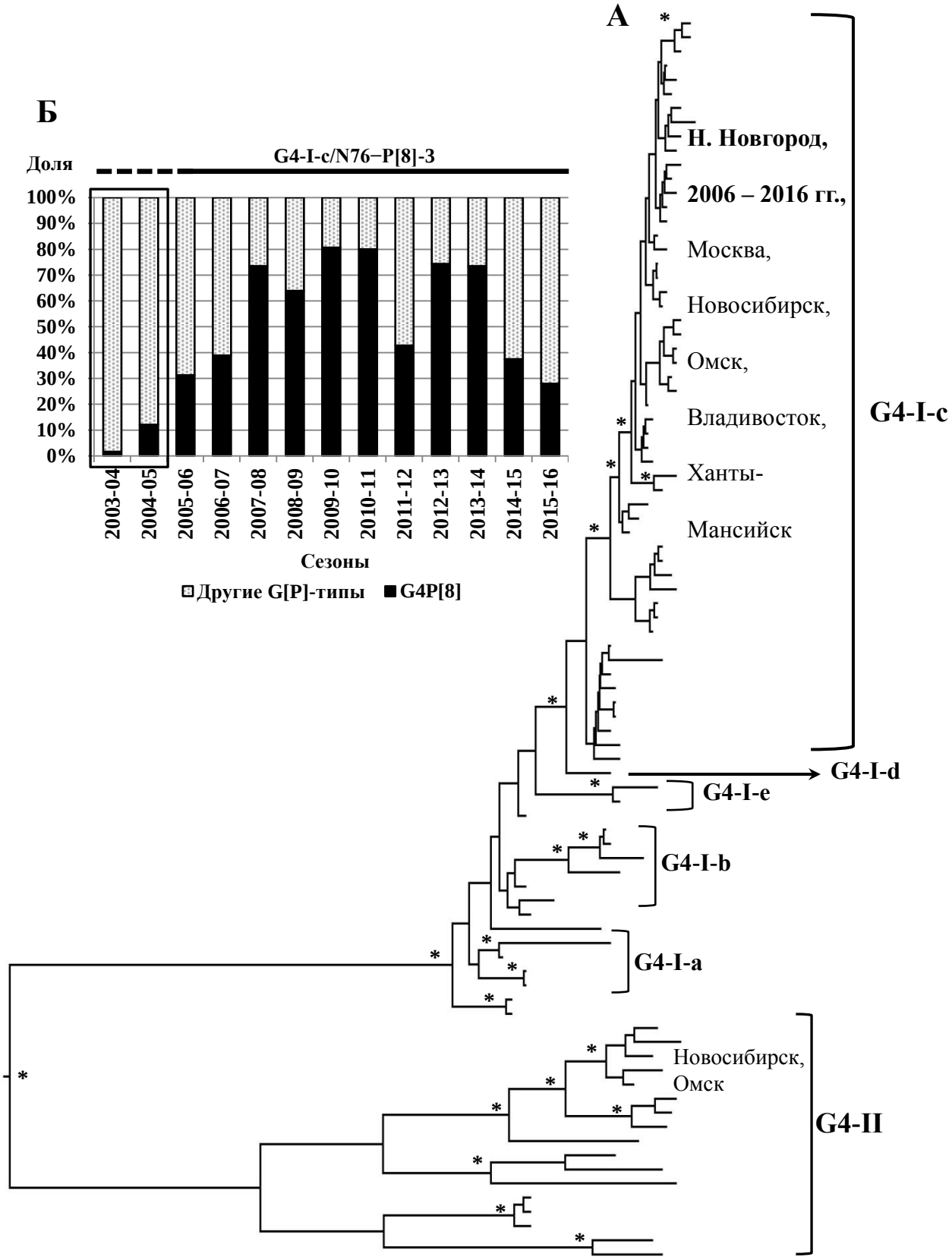

Рисунок 5. А − Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 ротавирусов генотипа G4P[8]. Узлы дерева со значением апостериорной вероятности более 95% отмечены звездочкой. **Б − Долевой вклад генотипа G4P[8] в типовую структуру нижегородской популяции ротавирусов в 2003-2016 гг.** Рамкой выделен период, ранее охарактеризованный Н. А. Новиковой и О. Ф. Федоровой.

циркуляции современными штаммами генотипа G4P[8] (Bok K. et al., 2002, Arista S. et al., 2005, Bucardo F. et al., 2007).

Согласно F. Bucardo et al. (2007), данный вариант генотипа G4P[8] вызвал эпидемию острого гастроэнтерита в Никарагуа в 2005 году и впоследствии получил широкое распространение в Южной Америке и во всем мире (Bucardo F. et al., 2007).

Аллель G4-I-c гена VP7 у ротавирусов в Нижнем Новгороде был ассоциирован с тремя аллелями гена VP4 (P[8]-3.1, P[8]-3.6 и P[8]-3.7), среди которых был наиболее распространен аллель P[8]-3.6, кодирующий белок, имеющий две аминокислотные замены (A191T и N194D) в структуре поверхностного антигенного эпитопа 8-1.

Таким образом, дана молекулярная характеристика доминировавшего в Нижнем Новгороде и широко распространенного в других городах России и в мире антигенно и генетически стабильного варианта ротавируса (G4-Ic/N76−P[8]-3.6). Представляется вероятным, что именно данная комбинация аллелей генов VP4 и VP7 позволила ротавирусам генотипа G4P[8] сохранять высокую активность циркуляции на протяжении 11 сезонов.

Характеристика ротавирусов генотипа G9. С целью изучения молекулярных особенностей ротавирусов типа G9P[8] были получены фрагменты нуклеотидных последовательностей гена VP7 12 изолятов. Также в анализ были взяты нуклеотидные последовательностей гена VP7 100 ротавирусов из четырех городов России и из 26 стран, размещенные в GenBank.

На филогенетическом дереве российские изоляты группировались с представителями двух линий (III и VI), согласно классификации T. G. Phan et al. (2007). Нижегородские ротавирусы, выявленные в 2011-2012 гг. и в 2014-2016 гг., относились к двум разным кластерам сублинии III-d (Рисунок 6 А). В первый кластер также вошли штаммы из Москвы, Новосибирска и Красноярска. Второй кластер составили ротавирусы из Турции и один изолят из Москвы.

Аминокислотная последовательность VP7 нижегородских штаммов разных кластеров характеризовалась различиями в пяти позициях (44, 65, 68, 70 и 139), которые не входили в структуру антигенных эпитопов 7-1 и 7-2 на поверхности белка.

По данным литературы ротавирусы сублинии G9-III-d возникли в середине 1990-х годов в США и в настоящий момент широко распространены в мире. На территории Нижнего Новгорода они были идентифицированы только в 2011 году. Это был общероссийский вариант, имеющий молекулярную формулу G9-III-d/70L−P[8]-3.6/194D.

Следующие два сезона характеризовались низкой долей генотипа G9 в популяции (1,0–3,4 %), которая в сезон 2014−2015 гг. существенно возросла, достигнув 35,1 % (Рисунок 6 Б). В сезон 2015 – 2016 гг. ротавирусы генотипа G9P[8] заняли доминирующее положение в нижегородской популяции (44,4 %).

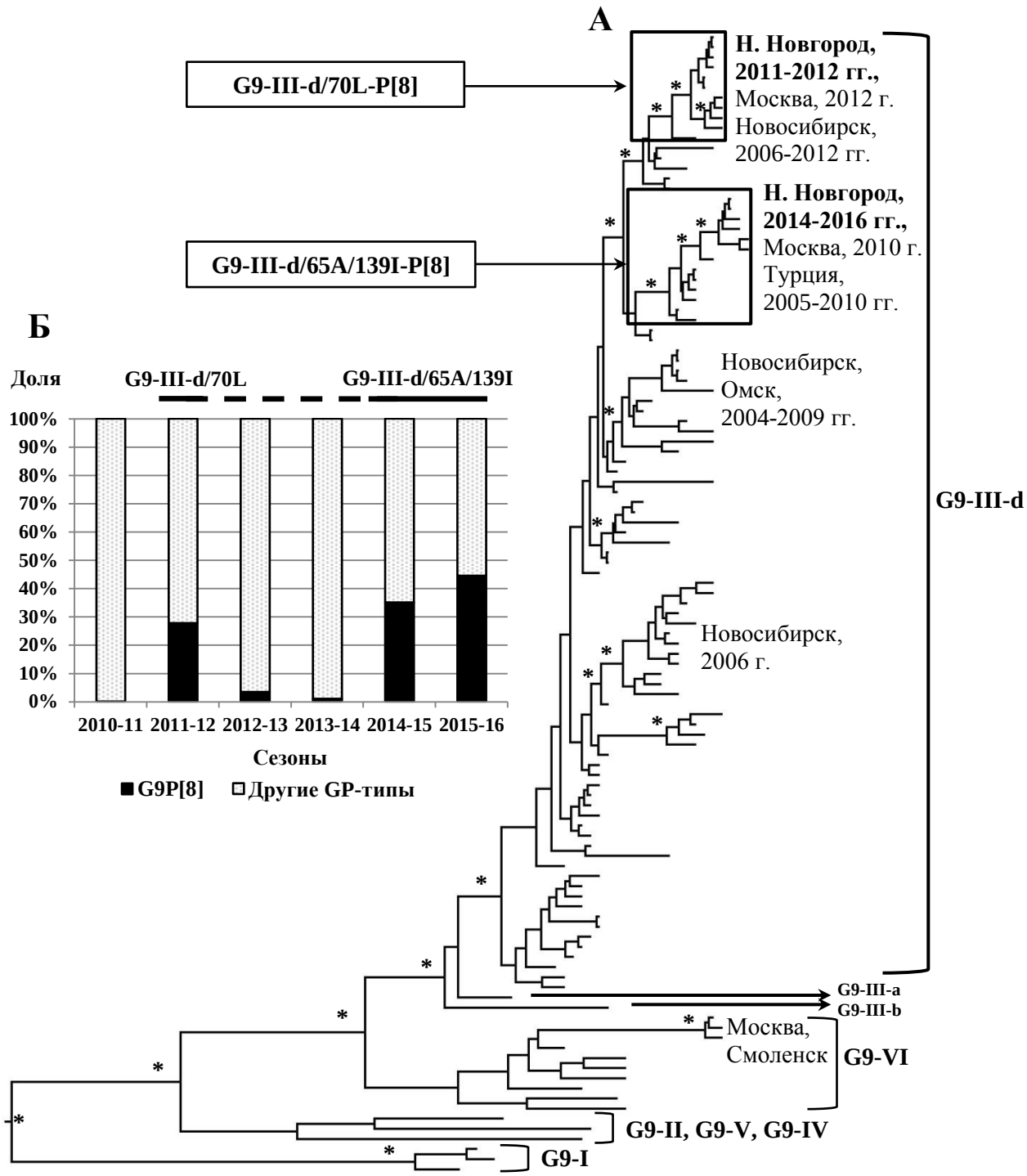

Рисунок 6. А − Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 ротавирусов генотипа G9P[8]. Узлы дерева со значением апостериорной вероятности более 95% отмечены звездочкой. **Б − Долевой вклад генотипа G9P[8] в типовую структуру нижегородской популяции ротавирусов в 2010−2016 гг.**

Увеличение активности циркуляции РВ генотипа G9P[8] в 2014 году сопровождалось появлением в популяции штаммов, филогенетически близких турецким.

Таким образом, охарактеризован новый вариант G9-III-d/65A/139I−P[8]-3.6/191T/194D. По гену VP7 он был родственен ротавирусам, выделенным в Турции и отличен от идентифицированного ранее общероссийского варианта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе дана молекулярная характеристика современных нижегородских и российских ротавирусов, проведен ретроспективный анализ первичной структуры генов и белков их наружного капсида, показано их внутригенотиповое разнообразие и филогенетические взаимоотношения, определены молекулярные маркеры широко распространенных и редких штаммов ротавируса разных генотипов и особенности их естественной многолетней циркуляции.

ВЫВОДЫ

1. С использованием оптимизированной методики мультиплексной ПЦР определены 11 G[P]-типов РВА, циркулировавшего в Нижнем Новгороде в ранее не охарактеризованный период времени (2005-2016 гг.). Показано временное перераспределение доминирующих типов: в 2005-2007 гг. преобладали ротавирусы генотипа G1P[8], в 2007–2015 гг. – G4P[8], в 2015−2016 гг. – G9P[8].
2. В нижегородской популяции РВА в 1984-2016 гг. идентифицированы представители двух филогенетических линий генотипа P[8]. На закрепление доминирующей линии P[8]-3 потребовалось 19 лет. Показано, что штаммы РВА линии P[8]-3 относились к пяти сублиниям и имели отличия в структуре антигенных эпитопов белка VP4.
3. Установлено, что ротавирусы генотипа G1P[8] в Нижнем Новгороде в изучаемый период времени характеризовались низкой активностью циркуляции и разнообразием аллелей генов VP7 и VP4. Обнаружен новый вариант вируса, имеющий замены аминокислот в антигенных эпитопах белков наружного капсида.
4. Выявлены генетически и антигенно стабильные на протяжении длительного времени общероссийские варианты ротавируса генотипов G3P[8] и G3P[9] и новый нижегородский вариант генотипа G3P[8], для которого не обнаружено аналогичных последовательностей гена VP7 в GenBank.
5. Дана молекулярная характеристика стабильного варианта ротавируса генотипа G4P[8], доминировавшего в течение 11 сезонов на территории Нижнего Новгорода и широко распространенного в России и в мире.
6. Показано, что доминирование ротавирусов генотипа G9P[8] в Нижнем Новгороде сопровождалось появлением нового варианта, филогенетически родственного штаммам РВА из Турции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Сашина, Т.А.** Определение полной нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания гена капсидного белка VP7 ротавирусов группы А и её анализ / Т. А. Сашина, О. В. Морозова, С. Г. Фомина, Н. В. Епифанова, Н. А. Новикова **// Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. -** 2012. - №. 2 (3). - С. 81-85.

2. Novikova, N. A. Rotavirus infection in children of Nizhny Novgorod, Russia: the gradual change of the virus allele from P[8]-1 to P[8]-3 in the period 1984-2010 / N. A. Novikova, O. V. Morozova, O. F. Fedorova, N. V. Epifanova, **T.A. Sashina,** E. I. Efimov **// Archives of Virology. -** 2012. - V. 157(12). - P. 2405-2409.

3. Епифанова, Н.В. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011-12 годах / Н.В. Епифанова, О.В. Морозова, **Т.А. Сашина**, Н.А. Новикова // **Медицинский алфавит.** - 2013. - Т. 4. (Эпидемиология и гигиена). - №. 24. - С.20-26.

4. Епифанова Н. В. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005-2012 годах. Доминирование генотипа G4P[8]. / Н. В. Епифанова, **Т. А. Сашина**, Н. А. Новикова, О. В. Морозова, С. Г. Фомина, Л. Б. Луковникова, А. Ю. Кашников **// Медицинский альманах. -** 2014. - №2 (32). - С. 52-57.

5. **Sashina, T.A.** Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia) / T. A. Sashina, O. V. Morozova, N. V. Epifanova, N. A. Novikova **// Archives of Virology. -** 2017. - V. 162(8). - P. 2387–2392.

Тезисы:

1. **Сашина, Т.А.** Вариабельность нуклеотидных последовательностей гена VP7 генотипа G1P[8], циркулирующих на территории Нижнего Новгорода / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Сборник трудов II Международной Интернет-конференциии «Актуальные вопросы биохимии и бионанотехнологий», Казань, 15-18 октября 2011 г. Казань: «Казанский университет». - 2012. - Т. II. - С. 283-285.

2. **Сашина, Т.А.** Вариабельность аминокислотной последовательности белка VP7 ротавирусов генотипа G1P[8] / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Пермь, 16-18 мая 2012 г.). - 2012. - Т. II. - С. 176-180.

3. **Сашина, Т. А.** Анализ нуклеотидной последовательности гена и аминокислотной последовательности белка VP7 ротавирусов генотипа G1P[8], циркулирующих в Нижнем Новгороде/ Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Материалы XVII Нижегородской сессии молодых ученых. Естественные,

математические науки (Нижний Новгород, 28-31 мая 2012 г.). Н. Новгород: НИУ РАНХиГС. - 2012. – С. 143-144.

4. Епифанова, Н.В. Выявление редких G/P-комбинаций ротавирусов группы А у детей с острой кишечной инфекцией / Н.В. Епифанова, **Т.А. Сашина,** О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 25-27 марта 2013 г.). - **Инфекционные болезни. -** 2013. - Т.11. - Приложение N 1. - С. 137.

5. **Сашина, Т.А.** Разнообразие геновариантов ротавируса генотипа G1P[8] в период низкой активности циркуляции / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций». - **Инфекция и иммунитет.** - 2013. - Т. 3. - N 2. - С. 168.

6. **Сашина, Т.А.** Молекулярно-генетическая характеристика ротавируса генотипа G3-P[9]-I2, выявленного в Нижнем Новгороде в сезон 2012-2013. / Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Материалы XVIII Нижегородской сессии молодых ученых. Естественные, математические науки (г. Нижний Новгород, 28-31 мая 2013). Н. Новгород: НИУ РАНХиГС. - 2013. – С. 161.

7. Сашина, Т.А. Генетическая и антигенная стабильность аллелей G4-I-C и P[8]-3 генов VP7 и VP4 ротавируса А / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 24-26 марта 2014 г.). - **Инфекционные болезни. -** 2014. - Т.12. Приложение № 1. - С. 278.

8. **Сашина, Т.А.** G[P] типы ротавируса А в г. Нижнем Новгороде: 2012-2014 / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации». - **Инфекция и иммунитет. -** 2014. - Т. 4. - № 1. - С. 91.

9. **Сашина, Т.А.** Филогенетический анализ ротавирусов генотипа G3 в довакцинальный период / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2015 г.), СПб.: ФБУН ННИИЭМ имени Пастера. - 2015. - С. 179-180.

10. **Сашина, Т.А.** Генетическая структура нижегородской популяции ротавируса в 2012-2015 гг. / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н.Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (25 мая 2016 г., г. Нижний Новгород). Нижний Новгород. – 2016. – С. 92-98.

11. **Сашина, Т.А.** Филогенетический анализ российских вариантов ротавируса генотипа G9 / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова // Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28-30 марта 2016 г.). - **Инфекционные болезни. -** 2016. – Т.14. - Приложение № 1. - С. 254.

12. **Сашина, Т.А.** Новый вариант ротавируса типа G9-P[8]-I1-E1, доминирующий в Нижнем Новгороде, близкородственный турецким штаммам / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.А. Новикова // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Москва, 1-3 ноября 2016 г.). М.: Грифон. - 2016. – С. 182-185.

13. Сашина, Т.А. Рост заболеваемости ротавирусной инфекцией и появление новых вариантов ротавируса генотипа G9P[8] в Нижнем Новгороде / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.В. Епифанова, Л.А. Солнцев, Н.А. Новикова // Материалы IX Всероссийского Ежегодного конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 27 - 29 марта 2017 г.) // **Инфекционные болезни.** - 2017. - Т.15. - Приложение № 1. - С. 249-250.

14. **Сашина, Т.А.** Антигенные варианты ротавируса человека в России / Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Материалы IX Всероссийского Ежегодного конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 27 - 29 марта 2017 г.). - **Инфекционные болезни.** - 2017. - Т.15. - Приложение №1. - С. 250.

15. **Сашина, Т.А.** Констелляции генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 в нижегородской популяции ротавирусов группы А / Т.А. Сашина, О.В. Морозова, Н.В. Епифанова, В.В. Зверев, Н.А. Новикова // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20 апреля 2017 г.).– Тамбов: ООО фирма Юлис, - 2017. - Т.1. – С. 278-279.