

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>



# Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг.

Петруша О.А.<sup>1✉</sup>, Корчевая Е.Р.<sup>1</sup>, Минтаев Р.Р.<sup>1</sup>, Исаков И.Ю.<sup>1</sup>, Никонова А.А.<sup>1</sup>, Мескина Е.Р.<sup>1,2</sup>, Ушакова А.Ю.<sup>2</sup>, Хадисова М.К.<sup>2</sup>, Зверев В.В.<sup>3</sup>, Файзулов Е.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

### Аннотация

**Цель** работы — анализ генетических характеристик штаммов ротавирусов группы А (РВА), циркулировавших в Москве в 2015–2020 гг., включая редкие штаммы, нетипируемые методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**Материалы и методы.** Исследовали 289 фекальных образцов от детей в возрасте от 1 мес до 17 лет, госпитализированных с острым гастроэнтеритом. Выявление ротавирусов в образцах проводили методами иммунохроматографии и обратной транскрипции (ОТ) с ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Секвенирование ротавирусного генома проводили по Сэнгеру и методом нанопорового секвенирования.

**Результаты и обсуждение.** В 131 клиническом образце была выявлена РНК РВА, в 125 случаях из них был установлен *G/[P]*-генотип. В общей структуре преобладали штаммы РВА с генотипом *G9P[8]I1* (37%), за ними следовали варианты *G3P[8]I2*, *G4P[8]I1*, *G2P[4]I2*, *G1P[8]I1* и *G3P[8]I1* (18, 15, 11, 5 и 2% соответственно). Семь (5%) изолятов были идентифицированы как *GxP[8]*. В 2015–2020 гг. в регионе снизилась частота встречаемости генотипа *G4P[8]I1* (с 39 до 9%) и выросла доля генотипа *G9P[8]I1* (с 6 до 37%) по сравнению с 2009–2014 гг. В 2018–2020 гг. выявлена высокая доля не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного штамма *G3P[8]I2*, широко распространившегося в мире в последние годы. Методом нанопорового секвенирования проведён анализ генома штамма *G3P[8]I2* и редкого штамма *G4P[6]I1*. Для штамма *G4P[6]I1* установлена тесная филогенетическая связь с ротавирусами свиней.

**Заключение.** За последние годы в генетической структуре РВА, циркулирующих на территории московского региона, произошли существенные изменения. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга ротавирусной инфекции и выборочного секвенирования генов РВА для уточнения данных типоспецифической ОТ-ПЦР-РВ. Из-за постоянных изменений генетического состава циркулирующих штаммов РВА требуется периодическая оптимизация систем генотипирования РВА на основе ОТ-ПЦР-РВ.

**Ключевые слова:** ротавирусы группы А, острый гастроэнтерит, *G/[P]*-генотипирование, нанопоровое секвенирование

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол № 6 от 24.09.2021).

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0525-2019-0037).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Петруша О.А., Корчевая Е.Р., Минтаев Р.Р., Исаков И.Ю., Никонова А.А., Мескина Е.Р., Ушакова А.Ю., Хадисова М.К., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):7–19.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>

## Molecular and genetic characteristics of group A rotaviruses detected in Moscow in 2015–2020

Olga A. Petrusha<sup>1</sup>✉, Ekaterina R. Korchevaya<sup>1</sup>, Ramil R. Mintaev<sup>1</sup>, Alexandra A. Nikonova<sup>1</sup>, Igor Yu. Isakov<sup>1</sup>, Elena R. Meskina<sup>1,2</sup>, Anna Yu. Ushakova<sup>2</sup>, Marima K. Khadisova<sup>2</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>3</sup>, Evgeny B. Faizuloev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>M. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

### Abstract

The **aim** of the study was to analyze genetic characteristics of strains belonging to group A rotaviruses (RVA) circulating in Moscow in 2015–2020, including rare strains non-typeable by polymerase chain reaction (PCR).

**Materials and methods.** A total of 289 stool samples were tested; the samples were collected from children aged 1 month to 17 years, hospitalized with acute gastroenteritis. Immunochromatography and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) assays were used for detection of rotaviruses in the samples. The rotavirus genome sequencing was performed using the Sanger technique and nanopore sequencing.

**Results and discussion.** RVA RNA was detected in 131 clinical samples, and the *G/[P]* genotype was identified in 125 samples. The general profile showed prevalence of RVA strains with the *G9P[8]I1* genotype (37%) followed by *G3P[8]I2*, *G4P[8]I1*, *G2P[4]I2*, *G1P[8]I1*, and *G3P[8]I1* variants (18, 15, 11, 5, and 2%, respectively). Seven (5%) isolates were identified as *GxP[8]*. In 2015–2020, the region reported a decline in *G4P[8]I1* genotype prevalence (from 39% to 9%) and an increase in the proportion of the *G9P[8]I1* genotype (from 6% to 37%) as compared to 2009–2014. In 2018–2020, a large number of cases with the previously unknown DS-1-like reassortant strain with the *G3P[8]I2* genotype were reported; the above strain has become widely common worldwide in the recent years. Nanopore sequencing was performed to analyze the genome of the *G3P[8]I2* strain and the rare *G4P[6]I1* strain. It was found that the *G4P[6]I1* strain was phylogenetically related to porcine rotaviruses.

**Conclusion.** In the recent years, the genetic diversity of RVA circulating in the Moscow Region has changed significantly. The obtained results prove the importance of continuous monitoring of rotavirus infection and selective sequencing of RVA genes to fine-tune data of the type-specific real-time RT-PCR. The ever-changing genetic composition of the circulating RVA strains calls for regular optimization of RVA genotyping systems based on real-time RT-PCR.

**Keywords:** group A rotaviruses, acute gastroenteritis, *G/[P]*-genotyping, nanopore sequencing

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Protocol No. 6, September 24, 2021).

**Funding source.** The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (subject no. 0525-2019-0037).

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Petrusha O.A., Korchevaya E.R., Mintaev R.R., Nikonova A.A., Isakov I.Yu., Meskina E.R., Ushakova A.Yu., Khadisova M.K., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Molecular and genetic characteristics of group A rotaviruses detected in Moscow in 2015–2020. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunologii*. 2022;99(1):7–19.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>

### Введение

Ротавирусы группы А (РВА) являются основной причиной госпитализации детей в возрасте до 5 лет с острым гастроэнтеритом в странах с низким охватом вакцинацией против ротавируса. В 2016 г. ротавирусная инфекция (РВИ) вызвала 258 млн эпизодов диареи и 128 500 случаев смерти среди детей в возрасте до 5 лет во всём мире [1].

В 2020 г. вакцинация против РВА была включена в национальные программы иммунизации

107 стран<sup>1</sup>. Иммунизация от РВИ в России включена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Четыре ротавирусные вакцины в настоящее время рекомендованы ВОЗ и лицензированы для использования: пятивалентные — RotaTeq («Merck & Co., Inc.»), ROTASIL (Serum institute of India PVT. Ltd.); и моновалент-

<sup>1</sup> URL: <https://preventrotavirus.org/vaccine-introduction/global-introduction-status>

ные — Rotarix («GlaxoSmithKline»), ROTAVAC («Bharat Biotech»). Массовая вакцинация против РВА снижает заболеваемость и частоту госпитализации с острым гастроэнтеритом во всех возрастных группах, особенно у младенцев и людей старше 65 лет [2].

РВА относятся к виду *Rotavirus A*, рода *Rotavirus*, семейства *Reoviridae*. Геном ротавирусов представлен 11 сегментами двухцепочечной РНК, кодирующими синтез 12 белков [3]. Современная система классификации ротавирусов предполагает генотипирование по всем 11 генам (*Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx*). Большинство циркулирующих РВА человека относятся к 3 эволюционным линиям, отличающимся конstellациями генома: *Wa*-подобные штаммы (*G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1*), *DS-1*-подобные (*G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2*) и *AU-1*-подобные штаммы (*G3-P[3]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3*) [3]. Ранее широко применялась схема типирования, в которой определялись только гены белков VP7 (*G*) и VP4 (*P*). *G/[P]*-генотипирование штаммов РВА выполняется в реакции ОТ с последующей мультиплексной полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) [4] или секвенированием соответствующих генов.

В настоящее время генотипы *G1P[8]*, *G2P[4]*, *G3P[8]*, *G4P[8]*, *G12P[8]* и *G9P[8]*, гомотипные или частично гетеротипные по отношению к используемым лицензированным вакцинам (RotaTeq и Rotarix), доминируют среди циркулирующих штаммов РВА во всем мире [5]. Описаны случаи как межвидовой передачи РВА от животных человеку, так и заражения человека штаммами, образованными в результате реассортации штаммов ротавирусов животных и человека [6–8].

Эволюционная изменчивость штаммов РВА во времени [9], территориальные различия в распределении циркулирующих штаммов, увеличение их разнообразия после введения иммунизации в некоторых регионах, изменение генотипической структуры как в странах с плановой вакцинацией, так и без нее требуют постоянного эпидемиологического мониторинга РВИ [10].

**Целью** настоящего исследования является анализ генетических характеристик штаммов РВА, циркулировавших в Москве в 2015–2020 гг., включая редкие штаммы, не типизируемые методом ПЦР.

## Материалы и методы

### Клинические образцы

Всего за 5 лет (2015–2020 гг.) было собрано 289 образцов стула у детей в возрасте от 1 мес до 17 лет с симптомами острого гастроэнтерита, госпитализированных в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Дети, прошедшие вакцинацию против

РВИ, не были включены в исследование. Информированное согласие было получено от родителей или законных представителей для всех испытуемых.

В 45 пробах антиген РВА был обнаружен методом иммунохроматографии (набор реагентов «RIDA Quick Rotavirus», «R-Biopharm AG»). Образцы фекалий собирались в стерильные контейнеры у пациентов с диарей (не более 72 ч после появления симптомов), до отправки в лабораторию образцы хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , затем отправлялись в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова для генетического анализа ротавирусов.

### Выделение РНК

Для изоляции РНК использовали осветлённые центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин) 10% фекальные экстракты, приготовленные в стерильном физиологическом растворе. Выделение РНК из экстрактов проводили набором «АмплиСенс® МАГНО-сорб» («ИнтерЛабСервис») в соответствии с инструкцией по применению. Образцы РНК хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Детекция ротавирусной РНК

Обнаружение РВА в клинических образцах методом ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) выполняли в формате одной пробирки с использованием праймеров и зондов, описанных ранее [11]. Генотипирование РВА двухэтапной мультиплексной ПЦР-РВ для генов белков VP7 (*G1*, *G2*, *G3*, *G4*, *G9*), VP4 (*P[4]*, *P[6]*, *P[8]*) и VP6 (*I1*, *I2*) проводили согласно методике [12]. Анализ генотипирования РВА, основанный на мультиплексной ОТ-ПЦР с последующим анализом продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле, использовали в качестве эталонного метода и выполняли, как описано в рекомендациях ВОЗ [4].

### Амплификация и секвенирование генов белков VP7 и VP4

Для секвенирования генов белков VP7 и VP4 штаммов *G3P[8]I2* амплификацию выполняли с использованием описанных ранее праймеров для секвенирования VP7F/VP7R [13] и VP4F/VP4R [14], образующих ампликоны размером 881 и 663 пар оснований соответственно. Аликвоты выделенной РНК (10 мкл) смешивали с 3 пмоль праймерами VP7F или VP4F, инкубировали при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин и охлаждали в течение 2–3 мин при комнатной температуре. Реакцию ОТ проводили в общем объёме 25 мкл, содержащем праймер ОТ, 25 единиц обратной транскриптазы MMLV («Синтол», Россия). Стадия ОТ включала инкубацию для синтеза кДНК при  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин и инактивацию обратной транскриптазы MMLV при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. Температурно-временной режим ПЦР-РВ:

95°C — 120 с; 95°C — 60 с, 52°C — 40 с, 72°C — 40 с (45 циклов); 72°C — 40 с. ПЦР-ампликоны каждого гена очищали с помощью набора «Cleanup Standard» («Евроген») и проводили секвенирование обеих цепей ДНК с использованием генетического анализатора «NANOPHORE®05» («Синтол») и реагентов компании «Синтол».

#### Нанопоровое секвенирование ротавирусного генома и биоинформатический анализ

Полногеномная кДНК ротавирусных генных сегментов была получена с помощью смеси праймеров unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2 и unRAR3 (табл. 1) для реакции ОТ. Для одновременной амплификации всех сегментов гена РВА использовали «универсальный» праймер Up [15] (табл. 1). Амплификация проводилась в следующей реакционной смеси: TaKaRa LA Taq полимеразы (2,5 ЕД), LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup>plus), 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (финальная концентрация Mg<sup>2+</sup> 5 мМ) («ТаКаРа»), dNTP 25 мМ («Синтол»), 40 пмоль Up праймера. Параметры амплификации: 95°C — 2 мин, затем 40 циклов при 95°C по 30 с, 65°C — 30 с, 68°C — 3,5 мин. ПЦР-ампликоны очищали экстракцией фенол/хлороформ. Концентрацию и чистоту ампликонов измеряли спектрофотометрическим методом (A260/230, 260/280).

Библиотеку ДНК для нанопорового секвенирования (НПС) получали с использованием набора реагентов «Rapid Sequencing Kit» на портативном секвенаторе «MinION» с использованием стандартной проточной ячейки R9 («Oxford Nanopore Technologies»). Был разработан конвейер, позволяющий точно классифицировать исходные данные НПС. Конвейер на основе языка программирования Python идентифицировал полученные прочтения, запуская BLAST-анализ для базы данных эталонных последовательностей сегментов генома ротавируса<sup>2</sup>. Затем проводилось картирование прочтений на референсную последовательность с использованием программы Minimap2 [16] и создание консенсусной последовательности с использованием скрипта<sup>3</sup>, написанного на языке Python. В консенсусной последовательности выбирались нуклеотиды с наибольшей частотой встречаемости в положении выравнивания.

В редких случаях, когда два нуклеотида обнаруживались в одном положении в равном количестве, второй нуклеотид игнорировался. Идентификацию генотипа РВА по нуклеотидной последовательности генных сегментов проводили с помощью онлайн-сервиса «Rotavirus A Genotype

**Таблица 1.** Праймеры для амплификации полноразмерных генных сегментов ротавирусов

**Table 1.** Primers for amplification of full length rotavirus gene segments

Праймер Primer	Последовательность праймера 5'–3' Primer sequence 5'–3'
unRAf1	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTWTWAAA
unRAf2	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTTTTTTT
unRAf3	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTTTTAAT
unRAR1	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGTCAYATC
unRAR2	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGTCACAWA
unRAR3	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCAGCCACATG
Up	GCCGGAGCTCTGCAGAATTC

Determination»<sup>4</sup>, основанном на программном обеспечении, написанном Dan Katzel [17].

Методика НПС генома ротавирусов подробно описана в статье Е. Faizuloev и соавт. [18].

#### Идентификационные номера GenBank (NCBI)

Нуклеотидные последовательности, соответствующие 10 сегментам генома изолятов Moscow-40/2020 (G3P[8]I2) и Moscow-1P/2015 (G4P[6]I1), депонированы в GenBank под номерами MW558493–MW558502 и MT876633–MT876642 соответственно. Частичные последовательности трех других штаммов с генотипом G3P[8]I2 были депонированы под номерами MT648671, MT648671, MT648671 для VP7 и MT814324, MT814326 для VP4.

#### Филогенетический анализ

Построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA-X [19] методом максимального правдоподобия (двухпараметрическая модель Kimura [20]). Bootstrap-анализ осуществляли на основе 1000 репликаций. В качестве референсных использовали штаммы РВА, рекомендованные Рабочей группой по таксономии ротавирусов [3], а также штаммы, имеющие, по данным BLAST-анализа, не менее чем 99,5% сходство с исследуемыми штаммами.

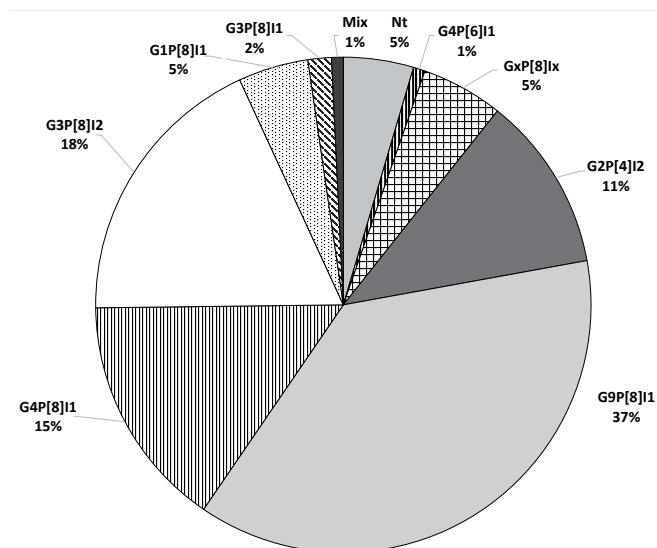
#### Результаты

Всего на наличие РНК или антигена РВА было проанализировано 289 фекальных образцов, собранных у детей, госпитализированных в стационар с симптомами острого гастроэнтерита. В 131 (45%) случае была обнаружена РНК, которую в дальнейшем использовали для G/[P]-генотипирования методом ОТ-ПЦР-РВ и/или секвенированием. В 125 случаях (95,4%) был определен G/[P]-генотип РВА,

<sup>2</sup> URL: <https://github.com/lioj/bioinformatics/blob/master/py/classificationStat.py>

<sup>3</sup> URL: <https://github.com/lioj/bioinformatics/blob/master/py/bam2consensus.py>

<sup>4</sup> URL: <https://www.viprbrc.org/brc/rvaGenotyper.spg?method=S&howCleanInputPage&decorator=reo>



**Рис. 1.** Распределение G/[P]-генотипов РВА, выделенных из 131 клинического образца в 2015–2020 гг.

GxP[8]Ix — частично типированные РВА; Mix — смешанные генотипы; Nt — нетипированные образцы.

**Fig. 1.** Distribution of RVA G/[P]-genotypes isolated from 131 clinical samples in 2015–2020.

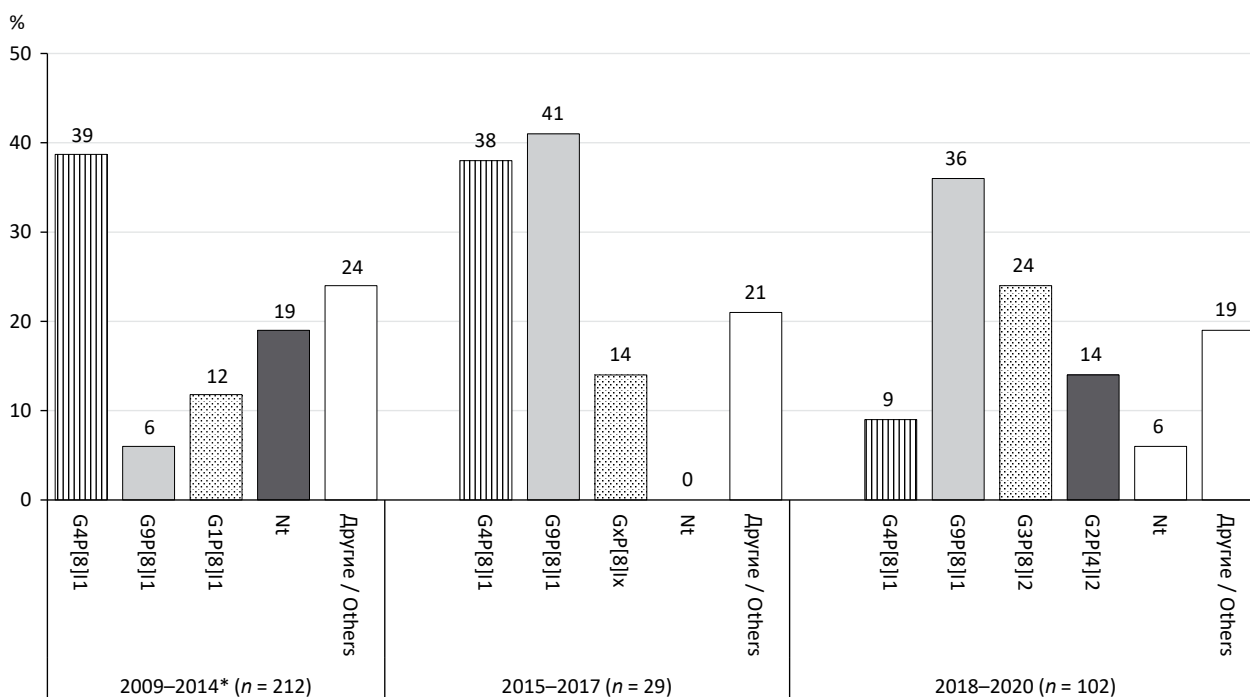
GxP[8]Ix — partially typed PVA; Mix — mixed genotypes; Nt — non-typed samples.

в 7 (5,3%) случаях РВА был типирован только по гену P, а для 6 (4,6%) образцов генотип установить не удалось.

Генетический состав исследованных штаммов РВА представлен на **рис. 1**. В 2015–2020 гг. штаммы РВА с генотипом G9P[8]I1 доминировали в общей структуре (37%), второе место занимали G3P[8]I2 (новый DS-1-подобный штамм) — 18%, далее — G4P[8]I1 (15%), G2P[4]I2 (11%), G1P[8]I1 (5%), G3P[8]I1 (2%). Семь (5%) штаммов, типированных только по гену P, относились к варианту гена P[8]. Также были обнаружены единичный случай смешанной инфекции двумя генотипами (G9P[8]I1 и G2P[4]I2) и редкий штамм с генотипом G4P[6]I1.

На **рис. 2** представлено распределение выявленных в Московском регионе генотипов РВА по годам. Доля генотипа G9P[8]I1 в последние годы значительно возросла, и в 2015–2020 гг. варьировала в пределах 36–41%. В то же время частота встречаемости генотипов G4P[8]I1 снизилась с 38 до 9%, а частота встречаемости генотипа G2P[4]I2 выросла до 14%.

Важно отметить, что для G/[P]-генотипирования некоторых штаммов с генотипом GxP[8]Ix требовалось частичное секвенирование генов белков VP7 (G) и VP4 (P), поскольку лабораторной тест-системой на основе ОТ-ПЦР-РВ их G/[P]-генотип установить не удалось [12]. Секвенирование и филогенетический анализ G и P генов РВА (номера GenBank: MT648671, MT648671, MT648671 для гена G и MT814324, MT814326 для гена P) в



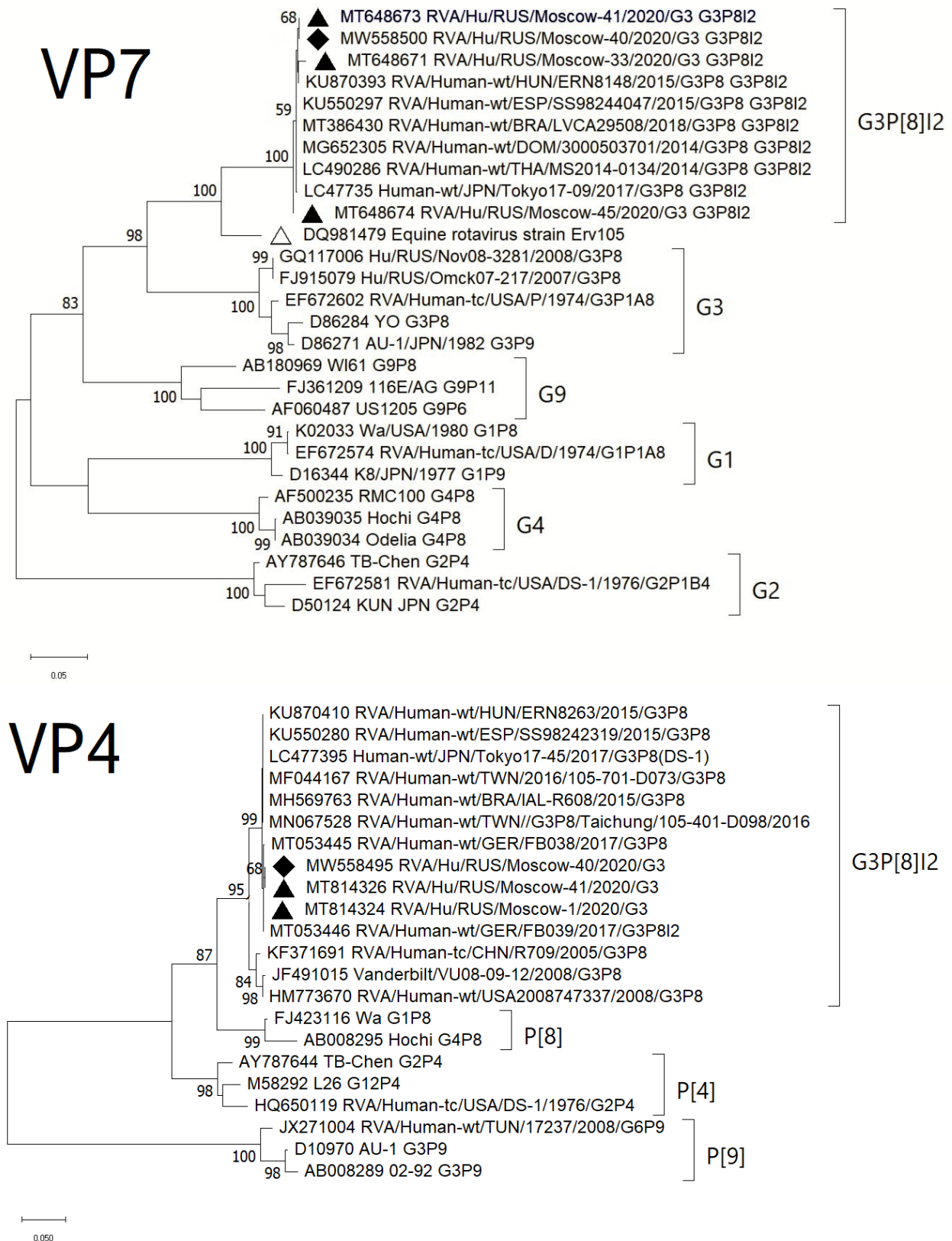
**Рис. 2.** Распространение G/[P]-генотипов, выявленных в Москве за 10 лет наблюдения (2009–2020 гг.) [12].

Nt — нетипированные образцы.

**Fig. 2.** Prevalence of G/[P]-genotypes detected in Moscow during the 10-year monitoring period (2009–2020) [12].

Nt — non-typed samples.





**Рис. 3.** Филогенетические деревья, основанные на секвенированных генах белков VP4 и VP7 нового штамма *G3P[8]I2*.

▲ — сегменты, секвенированные по Сэнгеру; ◆ — ген, секвенированный методом НПС; △ — ген белка VP7 PBA лошади.  
 Для обозначения штаммов использовался идентификационный номер GenBank, названия штаммов и *G/[P]*-генотип.

**Fig. 3.** Phylogenetic trees based on the sequenced genes of the VP4 and VP7 proteins of the new *G3P[8]I2* strain.

▲ — segments sequenced using the Sanger technique; ◆ — the gene sequenced using the NPS technique; △ — the equine RVA VP7 gene.  
 The respective GenBank accession number, name of strains and *G/[P]*-genotype were used for designation of strains.

**Таблица 2.** Результаты нанопорового секвенирования генома штаммов РВА с генотипами *G3P[8]I2* и *G4P[6]I1*  
**Table 2.** Results of nanopore sequencing of the genome of RVA strains with *G3P[8]I2* and *G4P[6]I1* genotypes

Сегмент Segment	Вирусный белок Viral protein	<i>G4P[6]I1</i>			<i>G3P[8]I2</i>		
		количество прочтений number of reads	покрытие сегмента, % segment coverage, %	генотип genotype	количество прочтений number of reads	покрытие сегмента, % segment coverage, %	генотип genotype
1	VP1	1372	100	R1	12 792	100	R2
2	VP2	3795	100	C1	11 193	100	C2
3	VP3	1995	100	M1	–	–	Mx
4	VP4	633	20	P[6]	2785	100	P[8]
5	NSP1	546	100	A1	53 841	100	A2
6	VP6	15 187	100	I1	16 479	100	I2
7	NSP3	14 566	100	T1	80 554	100	T2
8	NSP2	175	36	N1	40 022	100	N2
9	VP7	1465	100	G4	25 059	100	G3
10	NSP4	–	–	Ex	10 222	100	E2
11	NSP5/6	77	100	H1	11 351	100	H2

образцах с обнаруженным *GxP[8]I2* показали, что они принадлежат к генотипу *G3P[8]I2* (рис. 3). Выявлено, что отсутствие сигнала при генотипировании с помощью ОТ-ПЦР-РВ вызвано несоответствием нуклеотидов между геном *VP7* генотипа *G3P[8]I2* и соответствующим зондом. На нетипируемых образцах с генотипом *GxP[8]I2* была проведена моноспецифическая ПЦР с праймерами к *G3* и электрофоретической детекцией, которая выявила ампликоны ожидаемой подвижности во всех образцах (данные не представлены), что подтвердило их принадлежность к генотипу *G3P[8]I2*.

BLAST-анализ и филогенетический анализ продемонстрировали сходство секвенированных генов *VP7* и *VP4* с аналогичными генами РВА новой G3-DS-1-подобной констелляции, выявленной по всему миру. Схожие G3-DS-1-подобные штаммы были обнаружены в Австралии (2013) [21], Испании (2014–2015) [22], Венгрии (2016) [23], Бразилии (2016) [24], Индонезии (2016) [25], России (2019) [28] и в других странах (рис. 3).

Кроме того, было проведено НПС изолята Moscow-40/2020 с генотипом *G3P[8]I2* (табл. 2), в результате которого были идентифицированы варианты генов 10 сегментов генома (номера GenBank MW558493–MW558502) и выявлена высокая (91,0–99,8%) степень сходства консенсусной последовательности с референсным штаммом RVA/Human-wt/THA/SKT-281/2013/G3P[8] (номера GenBank LC086714–LC086724).

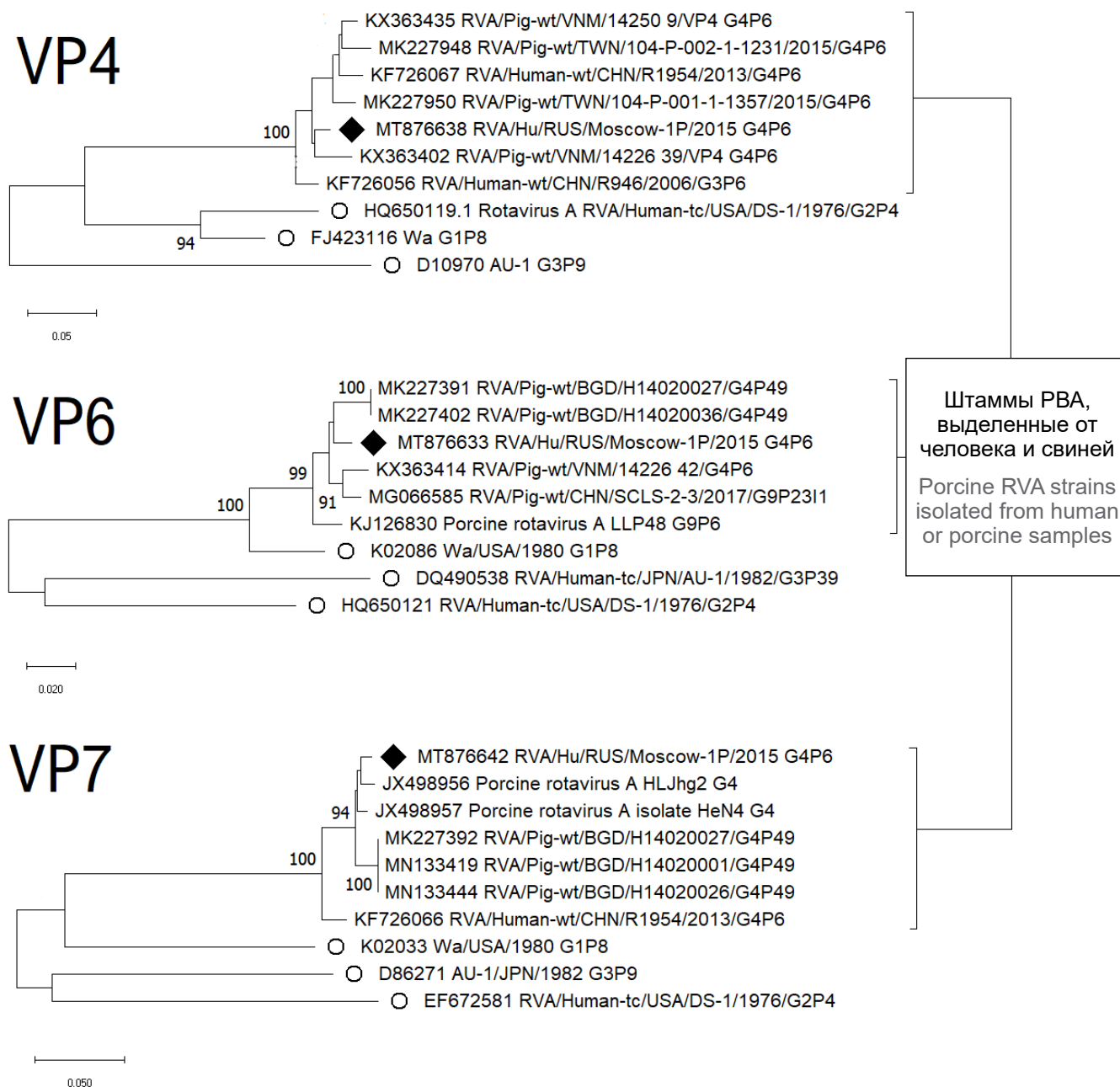
Редкий штамм *Moscow-1P/2015* с генотипом *G4P[6]I1* был обнаружен в клиническом образце, взятом у 8-летнего пациента в 2015 г. Методом ПЦР-РВ удалось установить только вариант гена *P[6]*. Секвенирование методами Сэнгера и НПС позволило установить генотип этого штамма по 10

генам: *G4-P6-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-Ex-H1* (номера GenBank MT876633–MT876642, MG271938), что соответствует 81,7% генома (табл. 2).

Филогенетический анализ генов *VP7*, *VP6* и *VP4* штамма *Moscow-1P/2015* (рис. 4) демонстрирует высокую степень сходства генов анализируемого образца с генами РВА свиней (номера GenBank: *VP4* — KX363402, MK227950, KX363435, MK227948; *VP6* — MK227391, MK227402, KX363414, MG066585, KJ126830; *VP7* — JX498957, JX498956, MK227392, MN133419, MN133444) либо штаммов РВА (штамм *RVA/Human-wt/CHN/R1954/2013/G4P[6]*, номера GenBank: KF726066–KF726076, KF726056), выделенных из фекалий человека, но имеющих доказанное происхождение от РВА свиней [7]. BLAST-анализ остальных 7 генов также демонстрирует высокую степень сходства (92–98%) нуклеотидной последовательности со штаммами РВА свиней. Таким образом, филогенетический анализ свидетельствует о происхождении штамма *G4P[6]* от РВА свиней.

## Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о существенных изменениях, произошедших в «генетическом ландшафте» РВА, циркулирующих в московском регионе. Согласно данным предыдущих исследований [12, 26], до 2015 г. большинство генотипированных РВА относились к генотипу *G4P[8]*. Наши данные свидетельствуют о постепенном снижении встречаемости данного генотипа с 38 до 9% в 2017–2018 гг. При этом доля генотипа *G9P[8]* в московском регионе увеличилась до 36–41%. Это соответствует данным независимых исследований, проведенных в Москве [27, 28], Нижнем Новгороде [29, 30] и Оренбурге [31].



**Рис. 4.** Филогенетические деревья, основанные на секвенированных генах белков VP4, VP7 и VP6 РВА, штамма *G4P[6]I1* (отмечены знаком ◆), референсных штаммах (*Wa*, *AU-1*, *DS-1*) представителей трёх эволюционных линий РВА (отмечены знаком ○) и генов РВА свиного происхождения, наиболее филогенетически близких генам штамма *Moscow-1P/2015* согласно BLAST-анализу.

Для обозначения штаммов использовался номер GenBank, название штамма и *G/[P]*-генотип.

**Fig. 4.** Phylogenetic trees based on sequenced genes of RVA VP4, VP7, and VP6 proteins, strain *G4P[6]I1* (marked by ◆), reference strains (*Wa*, *AU-1*, *DS-1*) representatives of three evolutionary lines RVA (marked by ○) and RVA genes of porcine origin, phylogenetically most closely related to genes of the *Moscow-1P/2015* strain based on the BLAST analysis.

The respective GenBank number, name of the strain and *G/[P]*-genotype were used for designation of strains.

В нашем исследовании изучались клинические образцы, собранные у детей, госпитализированных с острым гастроэнтеритом. Реальный «генетический ландшафт» и распределение генотипов РВА, циркулирующих в Москве, могут отличаться от полученных данных, поскольку мы не включали в исследование пациентов с лёгким или умеренным

гастроэнтеритом, не требующих госпитализации. Ранее в исследовании Е.Р. Мескиной показано, что тяжёлое течение ротавирусного гастроэнтерита может быть ассоциировано с конкретными генотипами РВА [32].

Особый интерес представляет штамм с генотипом *G3P[8]I2*, впервые выявленный нами в



2018 г. Его доля в общей структуре РВА составила 18%; по этому показателю он уступает только генотипу *G9P[8]II* (рис. 1). По результатам секвенирования и филогенетического анализа (рис. 3) мы предположили, что *G3P[8]I2* является родственным реассортантному штамму, впервые выявленному в Таиланде в 2013 г. [25] и широко распространившемуся в последние годы на территории Европы, Азии и Австралии [7, 22, 33, 34]. Данный штамм имеет *DS-1*-подобную констелляцию генов (*G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2*), за исключением гена белка VP7, который в обычных для данной констелляции случаях представлен геновариантом *G2*, в то время как для геноварианта *G3* более характерна *Wa*-подобная констелляция [35]. По предположению некоторых исследователей [21, 22, 25], штамм *G3P[8]I2* образовался в результате реассортации человеческого *DS-1*-подобного штамма и лошадиного штамма *Erv105* (номер GenBank: DQ981479.1), поскольку с геном белка VP7 этого штамма выявлено наибольшее сходство. При выполнении настоящего исследования мы, как и некоторые другие научные группы [22], столкнулись с невозможностью генотипировать новый штамм вируса методом типоспецифической ПЦР. Тест-система собственной разработки, как и праймеры, предложенные ВОЗ [4], не смогли выявить ген белка VP7 штамма *G3P[8]I2*. В то же время секвенирование по Сэнгеру и проведённый BLAST-анализ позволили достоверно определить геновариант как *G3*. Из-за точечных мутаций в генах *VP4* и *VP7* типоспецифические праймеры ПЦР всё чаще не могут идентифицировать их вариант [17]. Этот факт повышает значимость методов секвенирования в эпидемиологическом мониторинге РВИ.

Ещё один нетипичный штамм — *Moscow-IP/2015* с генотипом *G4P[6]II*, выявленный в единичном случае, — вероятно, также является результатом реассортации РВА человека и животных либо полностью имеет животное происхождение. В данном случае не ясно, произошло ли заражение данным штаммом в результате передачи от человека к человеку, либо человек заразился вирусом от животных. По данным литературы, доля РВА с генотипом *G4P[6]II* в общей структуре выявляемых у человека штаммов РВА невысока [6, 38]. Это может быть свидетельством какого-то ограничения для распространения *G4P[6]II* в человеческой популяции, например видового барьера, если предположить, что это штамм животного происхождения. В то же время следует принимать во внимание, что в большинстве подобных исследований обследованы дети, госпитализированные с ротавирусным энтеритом, тогда как случаи лёгкого протекания заболевания не рассматриваются. Поэтому мы не можем по этим данным судить о реальной распространённости того или иного штамма РВА.

Штаммы РВА свиней филогенетически близки штаммам ротавирусов человека [34], поэтому сложно установить, является ли исследуемый штамм следствием прямой передачи или реассортации [37–39]. Случаи реассортации или прямой межвидовой передачи РВА с генотипом *G4P[6]II* уже были описаны ранее как в Азии [6, 25, 40], так и в Европе [36].

## Заключение

В 2015–2020 гг. в генетической структуре РВА, циркулирующих на территории московского региона, произошли существенные изменения: снизилась встречаемость генотипа *G4P[8]II*, который занимал лидирующую роль в предыдущие годы; в то же время выросло количество случаев госпитализации с РВИ, вызванной штаммом *G9P[8]II*. Также в исследуемый период отмечено появление штаммов РВА предположительно животного происхождения как в единичных случаях (*G4P[6]II*), так и в значительном количестве (реассортантный *G3P[8]I2*), что является свидетельством важной роли межвидовой трансмиссии в эволюции РВА, патогенных для человека. Проведённое нами исследование подчёркивает необходимость постоянного мониторинга РВИ. Эпидемиологический мониторинг РВИ позволяет своевременно выявлять появление новых реассортантов РВА животных и человека, потенциально ускользающих от поствакцинального иммунитета. Выявленные нами и рядом авторов штаммы РВА, не типизируемые методом ОТ-ПЦР-РВ (генотипы *G3P[8]I2* и *G4P[6]II*) [6, 22], подчёркивают необходимость выборочного секвенирования генов РВА и оптимизации последовательностей типоспецифических праймеров для ОТ-ПЦР-РВ.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T., et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr.* 2018; 172(10): 958–65. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
2. Hoog M.L.A., Vesikari T., Giaquinto C., Huppertz H.I., Martinon-Torres F., Bruijning-Verhagen P. Report of the 5<sup>th</sup> European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC). *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(4): 1027–34. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1412019>
3. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
4. WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva; 2009. Available at: <https://www.who.int/vaccines-documents>
5. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>

6. Zhou X., Wang Y.H., Ghosh S., Tang W.F., Pang B.B., Liu M.Q., et al. Genomic characterization of G3P[6], G4P[6] and G4P[8] human rotaviruses from Wuhan, China: Evidence for interspecies transmission and reassortment events. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 33: 55–71. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.010>
7. Salamunova S., Jackova A., Csank T., Mandelik R., Novotny J., Beckova Z., et al. Genetic variability of pig and human rotavirus group A isolates from Slovakia. *Arch. Virol.* 2020; 165(2): 463–70. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04504-6>
8. Doro R., Farkas S.L., Martella V., Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2015; 13(11): 1337–50. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1089171>
9. Velasquez D.E., Jiang B. Evolution of P[8], P[4], and P[6] VP8\* genes of human rotaviruses globally reported during 1974 and 2017: possible implications for rotavirus vaccines in development. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(12): 3003–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1619400>
10. Hungerford D., Vivancos R., Read J.M., Iturriza-Gomicron M., French N., Cunliffe N.A. Rotavirus vaccine impact and socioeconomic deprivation: an interrupted time-series analysis of gastrointestinal disease outcomes across primary and secondary care in the UK. *BMC Med.* 2018; 16(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0989-z>
11. Freeman M.M., Kerin T., Hull J., McCaustland K., Gentsch J. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2008; 80(8): 1489–96. <https://doi.org/10.1002/jmv.21228>
12. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
13. Iturriza-Gomara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3696-3705.2001>
14. Simmonds M.K., Armah G., Asmah R., Banerjee I., Damanika S., Esona M., et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J. Clin. Virol.* 2008; 42(4): 368–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.02.011>
15. Froussard P. rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences. *PCR Methods Appl.* 1993; 2(3): 185–90. <https://doi.org/10.1101/gr.2.3.185>
16. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018; 34(18): 3094–100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
17. Maes P., Matthijnssens J., Rahman M., Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>
18. Faizuloev E., Mintaev R., Petruscha O., Marova A., Smirnova D., Ammour Y., et al. New approach to genetic characterization of group A rotaviruses by the nanopore sequencing method. *J. Virol. Methods.* 2021; 292: 114114. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114114>
19. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111–20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
21. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403–10. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>
22. Arana A., Montes M., Jere K.C., Alkorta M., Iturriza-Gomara M., Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44: 137–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.048>
23. Doro R., Marton S., Bartokne A.H., Lengyel G., Agocs Z., Jakab F., et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 — Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 2016; 63(2): 243–55. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.2.8>
24. Guerra S.F.S., Soares L.S., Lobo P.S., Penha Junior E.T., Sousa Junior E.C., Bezerra D.A.M., et al. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(12): 3131–8. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000626>
25. Komoto S., Tacharoenmuang R., Guntapong R., Ide T., Haga K., Katayama K., et al. Emergence and characterization of unusual DS-1-Like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141739>
26. Kaira A.N., Fayzuloyev E.B., Lavrov V.F., Svitich O.A., Solomay T.V., Nikonova A.A., et al. Epidemiological trends of morbidity and issues of rotavirus vaccination at the present stage. *Sanitary Doctor.* 2020; 6: 16–25. <https://doi.org/10.33920/med-08-2006-02>
27. Ivashchkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>
28. Yuzhakov G., Yuzhakova K., Kulikova N., Kisteneva L., Cherepushkin S., Smetanina S., et al. Prevalence and genetic diversity of group A rotavirus genotypes in Moscow (2019–2020). *Pathogens.* 2021; 10: 674. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060674>
29. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
30. Новикова Н.А., Сашина Т.А., Солнцев Л.А., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Погодина Л.В. и др. Проявление эпидемического процесса ротавирусного процесса в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2017; 94(5): 46–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-46-52>
31. Денисюк Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016–2017 гг. *Детские инфекции.* 2017; 16(4): 42–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45>
32. Мескина Е.Р., Ушакова А.Ю., Файзулов Е.Б., Бахтяров Г.Н., Киселева В.В. Сравнительная характеристика гастроэнтерита, вызванного ротавирусами генотипов G4P[8] и G9P[8], у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы (эпидсезон 2012–2013 гг.). *Инфекционные болезни.* 2017; 15(1): 23–8. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-1-23-28>
33. Katz E.M., Esona M.D., Betrapally N.S., De La Cruz De Leon L.A., Neira Y.R., Rey G.J., et al. Whole-gene analysis of inter-genogroup reassortant rotaviruses from the Dominican Republic: Emergence of equine-like G3 strains and evidence

- of their reassortment with locally-circulating strains. *Virology*. 2019; 534: 114–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.06.007>
34. Fujii Y., Oda M., Somura Y., Shinkai T. Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan. *Jpn J. Infect. Dis.* 2020; 73(1): 26–35.  
<https://doi.org/10.7883/yoken.JIID.2019.211>
35. McDonald S.M., Matthijnsens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S., et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000634.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>
36. Papp H., Borzak R., Farkas S., Kisfalvi P., Lengyel G., Molnar P., et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 19: 71–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.013>
37. Esona M.D., Geyer A., Banyai K., Page N., Aminu M., Armah G.E., et al. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1): 83–6. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080899>
38. Wang Y.H., Kobayashi N., Nagashima S., Zhou X., Ghosh S., Peng J.S., et al. Full genomic analysis of a porcine-bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 1094–102.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.21760>
39. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>
40. Imagawa T., Saito M., Yamamoto D., Saito-Obata M., Masago Y., Ablola A.C., et al. Genetic diversity of species A rotaviruses detected in clinical and environmental samples, including porcine-like rotaviruses from hospitalized children in the Philippines. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104465.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104465>
- REFERENCES
1. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T., et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr.* 2018; 172(10): 958–65.  
<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
2. Hoog M.L.A., Vesikari T., Giaquinto C., Huppertz H.I., Martinon-Torres F., Brujning-Verhagen P. Report of the 5th European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC). *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(4): 1027–34.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1412019>
3. Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
4. Manual of rotavirus detection and characterization methods. World Health Organization; 2009.  
Available at: <https://www.who.int/vaccines-documents/>
5. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>
6. Zhou X., Wang Y.H., Ghosh S., Tang W.F., Pang B.B., Liu M.Q., et al. Genomic characterization of G3P[6], G4P[6] and G4P[8] human rotaviruses from Wuhan, China: Evidence for interspecies transmission and reassortment events. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 33: 55–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.010>
7. Salamunova S., Jackova A., Csank T., Mandelik R., Novotny J., Beckova Z., et al. Genetic variability of pig and human rotavirus group A isolates from Slovakia. *Arch. Virol.* 2020; 165(2): 463–70. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04504-6>
8. Doro R., Farkas S.L., Martella V., Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2015; 13(11): 1337–50.  
<https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1089171>
9. Velasquez D.E., Jiang B. Evolution of P[8], P[4], and P[6] VP8\* genes of human rotaviruses globally reported during 1974 and 2017: possible implications for rotavirus vaccines in development. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(12): 3003–8.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1619400>
10. Hungerford D., Vivancos R., Read J.M., Iturriza-Gomara M., French N., Cunliffe N.A. Rotavirus vaccine impact and socioeconomic deprivation: an interrupted time-series analysis of gastrointestinal disease outcomes across primary and secondary care in the UK. *BMC Med.* 2018; 16(1): 10.  
<https://doi.org/10.1186/s12916-017-0989-z>
11. Freeman M.M., Kerin T., Hull J., McCaustland K., Gentsch J. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2008; 80(8): 1489–96. <https://doi.org/10.1002/jmv.21228>
12. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13.  
<https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
13. Iturriza-Gomara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3696-3705.2001>
14. Simmonds M.K., Armah G., Asmah R., Banerjee I., Damanika S., Esona M., et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J. Clin. Virol.* 2008; 42(4): 368–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.02.011>
15. Froussard P. rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences. *PCR Methods Appl.* 1993; 2(3): 185–90.  
<https://doi.org/10.1101/gr.2.3.185>
16. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018; 34(18): 3094–100.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
17. Maes P., Matthijnsens J., Rahman M., Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 238.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>
18. Faizuloev E., Mintaev R., Petrusha O., Marova A., Smirnova D., Ammour Y., et al. New approach to genetic characterization of group A rotaviruses by the nanopore sequencing method. *J. Virol. Methods.* 2021; 292: 114114.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114114>
19. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111–20.  
<https://doi.org/10.1007/BF01731581>
21. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403–10.  
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>

22. Arana A., Montes M., Jere K.C., Alkorta M., Iturriza-Gomara M., Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44: 137–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.048>
23. Doro R., Marton S., Bartokne A.H., Lengyel G., Agocs Z., Jakab F., et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 — is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2016; 63(2): 243–55. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.2.8>
24. Guerra S.F.S., Soares L.S., Lobo P.S., Penha Junior E.T., Sousa Junior E.C., Bezerra D.A.M., et al. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(12): 3131–8. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000626>
25. Komoto S., Tacharoenmuang R., Guntapong R., Ide T., Haga K., Katayama K., et al. Emergence and characterization of unusual DS-1-like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141739>
26. Kaira A.N., Fayzuloyev E.B., Lavrov V.F., Svitich O.A., Solomay T.V., Nikonova A.A., et al. Epidemiological trends of morbidity and issues of rotavirus vaccination at the present stage. *Sanitary Doctor.* 2020; 6: 16–25. <https://doi.org/0.33920/med-08-2006-02>
27. Ivashechkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>
28. Yuzhakov G., Yuzhakova K., Kulikova N., Kisteneva L., Cherepushkin S., Smetanina S., et al. Prevalence and genetic diversity of group A rotavirus genotypes in Moscow (2019–2020). *Pathogens.* 2021; 10: 674. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060674>
29. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
30. Novikova N.A., Sashina T.A., Solntsev L.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.Yu., Pogodina L.V., et al. Manifestations of epidemic process of rotavirus infection in Nizhny Novgorod in pre-vaccination period. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 94(5): 46–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-46-52> (in Russian)
31. Denisjuk N.B. Genetic characteristics of rotaviruses group A circulating in the Orenburg region in season 2016–2017. *Detskie infektsii.* 2017; 16(4): 42–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45> (in Russian)
32. Meskina E.R., Ushakova A.Yu., Fayzuloyev E.B., Bakhtoyarov G.N., Kiseleva V.V. A Comparative characteristic of gastroenteritis associated with G4P[8] and G9P[8] genotype rotaviruses in children hospitalized in Moscow (2012–2013 epidemic season). *Infektsionnye bolezni.* 2017; 15(1): 23–8. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-1-23-28> (in Russian)
33. Katz E.M., Esona M.D., Betrapally N.S., De La Cruz De Leon L.A., Neira Y.R., Rey G.J., et al. Whole-gene analysis of inter-genogroup reassortant rotaviruses from the Dominican Republic: Emergence of equine-like G3 strains and evidence of their reassortment with locally-circulating strains. *Virology.* 2019; 534: 114–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.06.007>
34. Fujii Y., Oda M., Somura Y., Shinkai T. Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan. *Jpn J. Infect. Dis.* 2020; 73(1): 26–35. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.211>
35. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S., et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000634. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>
36. Papp H., Borzak R., Farkas S., Kisfali P., Lengyel G., Molnar P., et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 19: 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.013>
37. Esona M.D., Geyer A., Banyai K., Page N., Aminu M., Armah G.E., et al. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1): 83–6. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080899>
38. Wang Y.H., Kobayashi N., Nagashima S., Zhou X., Ghosh S., Peng J.S., et al. Full genomic analysis of a porcine-bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 1094–102. <https://doi.org/10.1002/jmv.21760>
39. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>
40. Imagawa T., Saito M., Yamamoto D., Saito-Obata M., Masago Y., Ablola A.C., et al. Genetic diversity of species A rotaviruses detected in clinical and environmental samples, including porcine-like rotaviruses from hospitalized children in the Philippines. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104465. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104465>

#### Информация об авторах

**Петруша Ольга Александровна**<sup>✉</sup> — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, [petrusha.olga@gmail.com](mailto:petrusha.olga@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

**Корчевая Екатерина Романовна** — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

**Минтаев Рамиль Рафаилович** — м.н.с. лаб. генетики РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5398-3627>

**Никонова Александра Александровна** — к.б.н., зав. лаб. молекулярной биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>

**Исаков Игорь Юрьевич** — м.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5742-6550>

#### Information about the authors

**Olga A. Petrusha**<sup>✉</sup> — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [petrusha.olga@gmail.com](mailto:petrusha.olga@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

**Ekaterina R. Korchevaya** — junior researcher, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

**Ramil R. Mintaev** — junior researcher, Laboratory of genetics of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5398-3627>

**Alexandra A. Nikonova** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>

**Igor Yu. Isakov** — junior researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5742-6550>

*Мескина Елена Руслановна* — д.м.н., зав. отд. детских инфекций отдела терапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1960-6868>

*Ушакова Анна Юрьевна* — к.м.н., ассистент кафедры хирургии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-84387609>

*Хадисова Марима Касумовна* — к.м.н., н.с. отд. детских инфекций, отдел терапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия. <https://orcid.org/0000-0001-8293-6643>

*Зверев Виталий Васильевич* — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

*Файзулов Евгений Бахтиерович* — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.11.2021;  
принята к публикации 02.02.2022;  
опубликована 28.02.2022

*Elena R. Meskina* — D. Sci. (Med.), Professor, Department of children's infections, Therapy department, M. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1960-6868>

*Anna Yu. Ushakova* — Cand. Sci. (Med.), assistant, Department of children's infections, M. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-84387609>

*Marima K. Khadisova* — Cand. Sci. (Med.), Department of children's infections, Therapy department, M. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8293-6643>

*Vitaly V. Zverev* — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

*Evgeny B. Faizuloev* — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 12.11.2021;  
accepted for publication 02.02.2022;  
published 28.02.2022