

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологи

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ

Заведующая кафедрой  
к.м.н., доцент Т.А.Канашкова

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

УДК 616.9 022.36 036.22

Генотипический пейзаж ротавирусов – этиологических  
агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске

Диссертация на соискание степени магистра

Специальность: 1-31 80 12 «Микробиология, вирусология»

Выполнил:  
студент магистратуры:  
Логунова Надежда Витальевна

\_\_\_\_\_  
(подпись)  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г

Научный руководитель:  
д.м.н., доцент Самойлович Елена Олеговна

\_\_\_\_\_  
(подпись)  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Минск 2013

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	
<b>ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ .....</b>	
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	
<b>1.1. Классификация ротавирусов</b>	
<b>1.2. Структурная и молекулярная организация ротавируса</b>	
1.2.1. Морфология и свойства ротавирусной частицы.....	
1.2.2. Организация генома.....	
1.2.3. Белки ротавируса.....	
<b>1.3. Репродукция вируса.....</b>	
<b>1.4. Клинико-эпидемиологическая характеристика ротавирусной инфекции.....</b>	
1.4.1. Патофизиология ротавирусной инфекции.....	
1.4.2. Клинические проявления ротавирусной инфекции.....	
1.4.3. Иммунитет при ротавирусной инфекции.....	
1.4.5. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции.....	
1.4.6. Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции .....	
1.4.7 Эпидемиологическая характеристика ротавирусной инфекции	
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	
2.1 Материалы.....	
2.2 Методы исследования .....	
<b>ГЛАВА 3. Анализ госпитализированных случаев ротавирусных гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012г. ....</b>	
<b>ГЛАВА 4. Изучения генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих в г. Минске в 2012г.....</b>	
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

GAVI	Global Alliance for Vaccines and Immunization
IgG	иммуноглобулины класса G
IgM	иммуноглобулины класса M
IgA	иммуноглобулины класса A
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ДГИКБ	Городская детская инфекционная больница г. Минска
ИФА	иммуноферментный анализ
ОКИ	острые кишечные инфекции
ОТ- ПЦР	полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РВИ	ротавирусная инфекция
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНПЦ ЭМ	Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии
РЦГЭ и ОЗ	Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья
ЭПР	эндоплазматический ретикулум

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время острые кишечные инфекции занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний, уступая по частоте лишь гриппу и острым респираторным заболеваниям.

Еще 40 лет назад о ротавирусной инфекции не было известно. У заболевших диагностировали "эпидемический гастроэнтерит", о причинах которого не брались судить. Открытие ротавируса связано с именем австралийской исследовательницы Р. Бишоп, которой удалось в 1973 году обнаружить вирусные частицы в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки у людей, страдавших диареей. В 1979 году экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) был утвержден термин "ротавирус", который получил свое название из-за сходства строения вируса с колесом (rota - "колесо", лат) [40].

Ротавирусы группы А (семейство *Reoviridae*, род *Rotavirus*) являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей младшего возраста во всем мире [94]. Ежегодно в мире регистрируется более 100 млн. случаев ротавирусного гастроэнтерита, являющегося причиной 2 млн. госпитализаций и около 600 тыс. смертей детей в возрасте до 5-ти лет, при этом до 80 % летальных случаев приходится на развивающиеся страны [28]. Однако эпидемиологические исследования показывают, что и в экономически развитых странах данная проблема стоит достаточно остро [68].

Всеобщее распространение ротавирусной инфекции даже в условиях высоких гигиенических стандартов говорит о высоком уровне передачи этого вируса. Источником инфекции служит человек с манифестной или бессимптомной формой заболевания, а также вирусоноситель [4].

В настоящее время в мире накоплена обширная информация о генетическом разнообразии ротавирусов [43]. Среди ротавирусов человека различают 14 P- и 10 G-генотипов [44]. Существуют географические различия в распространенности ротавирусов различных генотипов даже в рамках одной страны, и частота их встречаемости изменяется со временем [81]. Опубликованы данные о находках новых, эпидемически значимых вариантов ротавирусов и большом числе нетипируемых штаммов [43]. В связи с этим для оценки эффективности уже созданных ротавирусных вакцин и разработки новых необходимо знание генетического спектра ротавирусов, распространенных на той или иной территории. Глобальный альянс вакцинации и иммунизации (GAVI) при сотрудничестве с ВОЗ в 2003 году инициировал Ротавирусную программу вакцинации. В рамках этой программы в каждом из регионов ВОЗ созданы региональные сети мониторинга ротавирусного гастроэнтерита, которые в целом охватывают более 40 стран мира.

Официальная регистрация ротавирусной инфекции в Беларуси на основе данных лабораторной диагностики проводится с 1993 г. Ежегодно в нашей стране выявляются тысячи заболевших ротавирусной инфекцией (от 635 в 1995 до 5203 в 2011г.). В структуре зарегистрированных ОКИ вирусной этиологии удельный вес ротавирусных гастроэнтеритов в отдельные годы превышал 90% [7].

Такие показатели говорят об актуальности данной инфекции для нашей страны и особенно ее детского населения.

Изучению распространенности ротавирусной инфекции в Республике Беларусь и проведению мониторинга циркулирующих генотипов данного возбудителя, основывающегося на использовании современных методов лабораторной диагностики, и посвящена данная работа.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

Ротавирусная инфекция является серьезной проблемой для детского населения, как в развитых, так и в развивающихся странах мира. Эта инфекция является достаточно частой причиной госпитализации детей. По данным литературы, удельный вес ротавирусных гастроэнтеритов среди всех других госпитализированных случаев гастроэнтеритов у детей достигает 30-50% [23]. В последнее десятилетие интерес к проблеме ротавирусной инфекции возрос в связи с разработкой, лицензированием и внедрением в национальные программы иммунизации ротавирусной вакцины. Плановая специфическая вакцинопрофилактика этой инфекции в Республике Беларусь пока не проводится. Для определения целесообразности внедрения вакцинопрофилактики требуется изучение бремени заболеваемости и определения генетического пейзажа циркулирующих ротавирусов.

**Цель исследования** – провести анализ госпитализированных случаев ротавирусных гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012 г. (заболеваемость по данным госпитализации, возрастное распределение, сезонность) и изучить генотипический пейзаж циркулирующих ротавирусов.

### **Задачи исследования:**

1. Провести анализ частоты встречаемости случаев гастроэнтеритов ротавирусной этиологии у детей в г. Минске в 2012 г., потребовавших госпитализации в инфекционный стационар.
2. Определить возрастное и сезонное распределение ротавирусных гастроэнтеритов у детей.

3. Провести генотипирование ротавиусов по белку VP7 наружного капсида (G-типирование).
4. Провести генотипирование ротавиусов по белку VP4 наружного капсида (P-типирование).

**Объектом исследования** являлись дети, госпитализированные в УЗ «ДИКБ» г. Минска в 2012г., с диагнозом острый гастроэнтерит. В качестве исследуемого материала использовались образцы стула от пациентов с подтвержденным диагнозом ротавирусного гастроэнтерита, вирусная РНК.

**Предметом исследования** являлось изучение распространенности ротавирусного гастроэнтерита у детей в г.Минске в 2012г. и разнообразие циркулирующих генотипов ротавируса.

#### **Новизна полученных результатов:**

Представлены новые данные за 2012 г., свидетельствующие о широком распространении ротавирусной инфекции среди детей в г. Минске. Установлен высокий удельный вес (20,3%) ротавирусов в структуре заболеваемости детей острыми гастроэнтеритами.

Проведено исследование молекулярно-генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих в Минске в 2012 г. Выполнено сравнение выявленных генотипов ротавирусов с генотипами, циркулирующими в предыдущие годы (2008-2011). Выявлено изменение генетического спектра популяции ротавирусов в течение пяти лет.

### **Практическая значимость полученных результатов:**

Полученные данные свидетельствуют, что бремя заболеваемости ротавирусной инфекцией в г. Минске является высоким. В 2012 г. показатель заболеваемости по данным госпитализации на 1000 детей в возрасте 0-5 лет составил 10,8 и был наиболее высоким среди детей в возрасте до года и 1 года (20,0 на 1000 и 17,0 на 1000, соответственно). Как известно, достаточно эффективным способом контроля этой инфекции является вакцинация. Полученные данные имеют большое значение для оценки экономической целесообразности внедрения вакцинации против ротавирусной инфекции в Республики Беларусь.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В анализируемый период (2012 г.) в г. Минске ротавирусная инфекция являлась частой причиной госпитализации детей в инфекционный стационар. Частота встречаемости острого гастроэнтерита ротавирусной этиологии среди других госпитализированных диарейных заболеваний у детей 0-5 лет составила 20,3%. Ротавирусный гастроэнтерит характеризовался зимне-весенней сезонностью и преимущественным вовлечением в эпидемический процесс детей в возрасте 0-1 год.

2. Результаты генотипирования ротавирусов по генам VP7 и VP4 с использованием мультиплексной полугнездовой ПЦР свидетельствуют о том, что пейзаж ротавирусов – этиологических агентов диареи у детей в г. Минске – являлся многообразным и был представлен ротавирусами пяти G (G4, G3, G1, G2, G9) и двух P (P8, P4) типов. Преимущественное распространение получил ротавирус генотипа G4P[8], на втором месте по частоте встречаемости был генотип G3P[8], на третьем G1P[8], в то время как

в глобальном масштабе наиболее распространенным является ротавирус G1P[8].

### **Структура и объем работы**

Работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, выводов, библиографического списка, включающего список использованных источников (12 отечественных и 83 иностранных). Работа изложена на 63 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами и 12 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Современные представления о ротавирусах и ротавирусной инфекции

#### 1.1. Классификация ротавирусов

Семейство *Reoviridae* входит в группу вирусов с двуцепочечным РНК-геномом, не имеющих липополисахаридной оболочки. Оно состоит из одиннадцати родов, представители которых вызывают болезни желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей у млекопитающих и птиц. Ротавирусы относятся к роду *Rotavirus*, включающему большое число сходных по структуре вирусов, вызывающих гастроэнтериты у человека и животных.

Род *Rotavirus* по наличию группоспецифического антигена VP6 разделяют на семь групп, обозначаемых буквами латинского алфавита от А до G [39]. Инфицирование человека происходит ротавирусами групп А, В и С. Ротавирусы способны поражать как взрослых, так и детей различного возраста. Наибольший интерес в клинической вирусологии вызывают ротавирусы группы А.

Ротавирусы группы В встречаются редко, передаются водным путем и вызывают острые кишечные расстройства в основном у взрослых. Первые обширные вспышки диареи, вызванные ротавирусами группы В и охватившие до миллиона человек, были зарегистрированы в начале 1990-х годов в Китае [76]. В последние годы опубликованы данные о спорадических случаях инфекций, вызванных ротавирусами группы В, в Индии, Бангладеш и Китае [14].

Ротавирусы группы С встречаются чаще, чем ротавирусы группы В, и циркулируют среди взрослых и детей старшего и юношеского возраста. К настоящему времени описаны спорадические случаи инфекции, вызванные ротавирусами группы С, в Австралии, Азии, Европе (Англия, Венгрия, Испания, Россия, Словения, Финляндии, Швеция), Африке (Кения, Нигерия),

США, Южной Америке [29]. Внутри каждой группы ротавирусы делятся на серотипы [39]. Идентификацию серотипа ротавируса осуществляют на основании антигенной специфичности его поверхностных белков VP4 (Р-тип) и VP7 (G-тип). Р-серотип подразделяется на субтипы А и В. Определение серотипа ротавируса является достаточно трудоемкой задачей и требует соответствующих реагентов (моноклональных антител), поэтому при характеристике вируса в настоящее время преимущественно определяют его генотип. При этом для G-типа серотипы и генотипы вируса совпадают. В то же время, число Р-генотипов значительно превышает число Р-серотипов, поскольку гены, кодирующие один и тот же Р-серотип, могут различаться. Чтобы избежать путаницы в обозначениях, Р генотип записывается в квадратных скобках: Р[8], Р[4] и др. К настоящему времени выявлено 23 G генотипа и 32 Р генотипа ротавирусов [61].

Теоретически при произвольной комбинации G и Р типов может образоваться огромное количество различных вариантов ротавирусов, однако реально выявляемое число G/Р комбинаций оказывается значительно меньшим. В настоящее время в Европе и в мире в целом наиболее широко распространены 5 генотипов ротавирусов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8]. Однако наряду с основными генотипами в различных регионах мира обнаруживаются новые редкие G/Р комбинации. Распределение основных генотипов на определенной территории может значительно меняться от года к году [61].

В Республике Беларусь ежегодно выявляются несколько тысяч случаев ротавирусной инфекции. Информация об основных генотипах ротавирусов, циркулирующих на территории страны, носит ограниченный характер. По имеющимся исследованиям в стране циркулируют 4 основных G генотипа: G1, G2, G3 и G4. Преобладающим Р генотипом оказался Р[8] – 86,3%, реже встречается Р[4]. По данным В.Г. Гудкова (2010 г.) ведущую роль среди играют G4P[8] и G1P[8] генотипы, составившие вместе 83,1%

генотипированных ротавирусов, обнаружены также ротавирусы генотипов G2P[4], G3P[8] и G2+3P[8] [8].

## **1.2. Структурная и молекулярная организация ротавируса**

### **1.2.1. Морфология и свойства ротавирусной частицы**

Вирус получил свое название от латинского *rota* — колесо, так как вирусные частицы под электронным микроскопом выглядят как маленькие колесики с широкой ступицей, 20 короткими "спицами" и круговым ободком. Вирион имеет икосаэдрическую форму с диаметром от 70-75 нм до 100 нм, включая поверхностные белковые «шипы» [63]. Вирусная частица состоит из ядра, включающего в себя геном, представленный одиннадцатью сегментами двуцепочечной РНК (дцРНК), окруженный тремя концентрическими слоями белковых оболочек [39].

Внешний слой (наружный капсид) состоит из 780 единиц гликопротеина VP7 и 60 шипов длиной 12 нм, образуемых димерами белка VP4 ; средний слой (внутренний капсид) – из 260 тримеров белка VP6; внутренний слой – из 60 димеров белка VP2. В пределах внутренней белковой оболочки на один сегмент геномной РНК приходится одна или несколько молекул РНК-полимеразы VP1 и гуанилил-трансферазы VP3 [38,39].

Белки VP1, VP2, VP3 и геном образуют вирусное ядро ротавируса. Ядра, окруженные белком VP6 – так называемые вирусоподобные частицы – обладают транскриптазной активностью и являются источником вирусной мРНК в клетке.

Ротавирусные частицы обладают определенным полиморфизмом, поэтому при электронной микроскопии выявляют несколько видов частиц [39]:

- зрелые "полные" вирионы (76,5 нм) – трехслойные частицы (TLP), обладающие ядром и полным набором оболочек;
- "неполные" вирионы (70 нм) – шероховатые вирусоподобные частицы, двухслойные частицы (DLP), отсутствует наружный капсид;
- сердцевины (50 нм) – ядра без оболочек, однослойные частицы (SLP), отсутствуют внутренний и наружный капсиды;
- тубулярные образования – продукты VP6.

Инфекционной активностью обладают только зрелые трехслойные частицы вируса. "Неполные" вирионы и сердцевины не инфекционны.

Вирус устойчив в окружающей среде, относительно стоек к воздействию моющих средств [75]. На различных объектах окружающей среды вирусы сохраняют жизнеспособность от 10-15 дней до месяца (в зависимости от температуры и влажности), в фекалиях – до 7 месяцев. Ротавирусы дезинфицируются 95% этанолом, фенолом, формалином и жидкостями с  $pH < 2$  [38].

### **1.2.2. Организация генома ротавируса**

Геном ротавируса содержит одиннадцать фрагментированных сегментов двуцепочечной РНК (дцРНК), которые кодируют 6 структурных и 6 неструктурных белков [63].

Электрофоретип ротавирусов, т. е. расположение сегментов генома в полиакриламидном геле, является устойчивым генетическим признаком, характерным для определенного штамма [4,38]. Полный размер генома - 18 556 п.н., общий вес генома –  $12 \times 10^6$  Д, что составляет 12-15% от веса вирусной частицы.

Большинство сегментов моноцитронны и каждый кодирует один белок, за исключением 11-го сегмента, кодирующего два белка - NSP5 и NSP6 [38,48].

Каждый сегмент геномной дцРНК содержит на 5-конце метилированный кэп (m<sup>7</sup>GpppG(m)GPy) и 5'-нетранслируемую последовательность. Затем следует открытая рамка считывания, кодирующая белки, далее 3'-некодирующая последовательность, оканчивающаяся 3'-концевым цитидином. Вирусные мРНК не полиаденилированы. 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности каждого геномного сегмента содержат консервативные терминальные участки длиной 7-10 п.н. Предполагают, что они важны для упаковки и регуляции экспрессии ротавирусных генов на уровне транскрипции, трансляции и репликации [39].

Знание структурной организации генома ротавируса имеет большое значение для понимания его участия в различных ферментативных процессах внутри капсида. В исследованиях *in vitro* показано, что транскрипционные частицы вируса – это высокоэффективные молекулы, которые способны к многократным циклам транскрипции. В течение каждого цикла транскрипции сегмент дцРНК должен двигаться вокруг заякоренной полимеразы (VP1), раскручиваться, отделяться, присоединяться и перематываться для дальнейших циклов транскрипции. Транскрипция – очень быстрый процесс, поэтому структурная организация генома ротавируса должна соответствовать динамичности процесса транскрипции [17,48].

Криоэлектронная микроскопия показала, что геном ротавируса формирует додекаэдральную структуру, в которой сегменты дцРНК взаимодействуют со слоем белка VP2. Геном вируса упорядочен и формирует концентрические слои, уложенные в виде спиральной воронки. Концентрические слои РНК находятся друг от друга на расстоянии 28-30 нм, которое может увеличиваться до 30-32 нм, если спирали РНК принимают

гексагональную упаковку. При различных химических условиях, изменениях значений рН, сегменты генома проявляют уникальную способность к обратимому уплотнению и расширению внутри капсида. Эти преобразование является структурными, так как дцРНК не разрушается. Таким образом, уплотнение и расширение генома является следствием изменения зазора между спиральями РНК. Эти исследования демонстрируют высокую устойчивость капсида и эластичность генома, которые являются необходимыми условиями для проведения непрерывной транскрипции всех сегментов РНК внутри двухслойной вирусной частицы [71].

Для ротавирусов характерна высокая степень изменчивости. Известно три механизма, приводящих к генетическому разнообразию: точечные мутации, реассортация сегментов генома и рекомбинация. Ротавирусы имеют высокую частоту мутаций, что обусловлено функционированием собственной РНК полимеразы. Предполагают, что в среднем на каждую репликацию генома происходит одна мутация. Реассортация, т.е. перераспределение фрагментов сегментированного генома, происходит с высокой частотой в период смешанной инфекции, в которой участвует два или более ротавирусов [15]. Реассортация обуславливает многообразие циркулирующих серотипов ротавируса. Рекомбинация и родственная перегруппировка сегментов вирусной РНК (частичная геновая дупликация или делеции) играют незначительную роль в обеспечении разнообразия ротавирусов, но могут быть важны в продолжительном периоде вирусной эволюции [15].

### **1.2.3. Вирусные белки**

Белки, связанные с геномной РНК, по месту расположения можно разделить на две группы: накапливающиеся в вироплазме или цитоскелете. Полагают, что белки, накапливающиеся в вироплазме, участвуют в

репликации РНК. Все неструктурные белки, кроме NSP4, взаимодействуют с вирусной РНК [40] (рисунок 1).

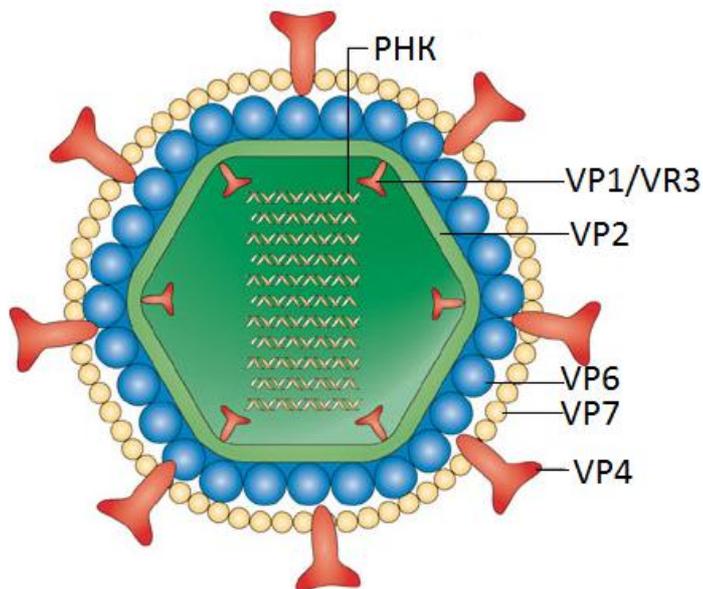


Рисунок 1 – Строение вириона ротавируса (Angel J. et al., 2007)

### **Структурные белки ротавируса.**

Структурные белки VP1, VP2 и VP3 составляют сердцевину ("кор") ротавирусной частицы и аккумулируются в вироплазме инфицированных клеток [39].

**VP1** кодируется первым сегментом генома и включен в процесс репликации - это РНК-зависимая РНК-полимераза. Доказано, что для инициации синтеза РНК необходимо присутствие и частичная сборка белков сердцевинки VP2 и VP3 [70]. Таким образом, вирусная полимеразы способна завершить синтез РНК только тогда, когда белки сердцевинки готовы к упаковке вновь синтезированных РНК. VP1 способен принимать участие в реакциях иммунопреципитации, иммунофлуоресценции и иммуноблота [38].

**VP2** кодируется вторым сегментом генома и является основным компонентом сердцевинки, которая состоит из 120 молекул, организованных в 60 тримеров. Белок VP2 обладает РНК-связывающей активностью [39]. Одной из основных функций VP2 может быть влияние на структурную

организацию генома, которое способствует эндогенной транскрипции. Установлено, что VP2 обладает детерминантами, которые необходимы для сборки других белков вириона ротавируса. VP2 составляет 15 % от молекулярной массы вириона и может образовывать вирусоподобные частицы, у которых отсутствует нуклеиновая кислота[38]. VP2 высокоиммуногенен и обладает эпитопами, ответственными за подгрупповую специфичность[62]. Присутствие антител к этому белку в сыворотке является индикатором перенесенной инфекции[38].

**VP3** кодируется третьим сегментом генома. Этот белок (835 а.о.) присутствует в небольших количествах и является многофункциональным кэпирующим ферментом, обладающим гуанилил- и метилтрансферазной активностью[39].

**VP6** кодируется шестым сегментом генома, является главным структурным белком вирусных частиц и образует внутренний капсид вириона, составляя 51 % от общей молекулярной массы ротавируса. Белок VP6 выполняет две основные функции - проникновение в клетку и эндогенная транскрипция, осуществляя их через взаимодействие с белками наружного капсида VP4, VP7 и внутренним белком VP2 [38,62].

**VP4** кодируется четвертым сегментом генома и является негликозилированным, протеазочувствительным белком. Прикрепление и проникновение вируса в чувствительные клетки осуществляется посредством поверхностных шипов, образованных димерами VP4. Кроме этого VP4 участвует в реакциях геагглютинации и нейтрализации [38]. Белок имеет два различных домена. N-конец, составляющий 60 % VP4, является глобулярным доменом, богатым р-складками. Другой домен представлен длинным С-концом, богатым а-спиралями. В многоступенчатом процессе проникновения ротавируса в клетку конформационная приспособляемость и гибкость VP4 играют важную роль [48].

**VP7** кодируется в зависимости от штамма 7, 8 или 9 сегментом генома и представляет второй белок наружного капсида, составляющий 30 % общей молекулярной массы вириона. VP7 – интегрированный белок, включенный в состав мембраны ЭПР, с ориентацией в просвет протока. Предполагается, что VP7 может взаимодействовать с поверхностными молекулами клетки после прикрепления вируса через шипы VP4 [16]. VP7 также необходим для удаления временной липидной оболочки в течение заключительного этапа вирусного морфогенеза [55,79].

VP7 – основной типоспецифический антиген, определяющий существование целого ряда G-серотипов ротавируса, и основной нейтрализующий антиген, определяющий формирование протективного иммунитета. VP7 несет на себе несколько вариабельных регионов, которые определяют серотиповую специфичность ротавируса. Эти области консервативны в пределах одного серотипа и отличаются у разных серотипов[69]. В настоящее время известно 15 G-серотипов ротавирусов группы А, из которых 10 циркулируют в человеческой популяции [59,72,87]. Белки наружного капсида VP4 и VP7 образуют сотоподобную решетку и определяют процесс проникновения вируса в клетку, а также такие важные свойства, как клеточный тропизм и вирулентность ротавируса [40].

### **Неструктурные белки ротавируса.**

**NSP1** кодируется пятым сегментом генома и образуется на ранних стадиях после заражения клеток. NSP1 обладает наибольшей вариабельностью аминокислотной последовательности. У некоторых штаммов ротавируса этот белок содержит цинк-связывающий домен[40,46]. В инфицированной клетке NSP1 связывается с фактором IRF3 (стимулирует продукцию интерферона) и способствует его деградации, тем самым вызывая уменьшение выработки интерферона[21,52].

**NSP2** кодируется в зависимости от штамма вируса 7, 8 или 9 сегментом генома и ассоциирован с вироплазмой инфицированных клеток.

Он полиморфен и может присутствовать как в форме мономера (317 а.о.), так и мультимера. Предполагают, что NSP2 может функционировать как молекулярный двигатель для облегчения упаковки генома, используя энергию от гидролиза НТФ[38,84]. В присутствии структурных белков NSP2 проявляет репликазную активность[54,84]. В процессе вирусного морфогенеза NSP2 участвует в продуцировании "пустых" вирусных частиц[39].

**NSP3** кодируется седьмым: сегментом генома и ассоциирован с цитоскелетом. Это белок, может быть мультимером, но чаще существует в форме димера[39]. NSP3 облегчает перенос мРНК, распознавая их 3'-концевую последовательность. NSP3 взаимодействует с клеточным белком RoXaN, предполагают что это взаимодействие способствует регуляции транскрипции[90].

**NSP4** кодируется десятым сегментом генома. Это неструктурный гликопротеин (175 а.о.) и характеризуется как вирусный энтеротоксин [19,41]. NSP4 играет важную роль в патофизиологическом процессе, вызывающем диарею - снижает поглощение глюкозы эпителиоцитами, а также стимулирует секрецию соляной кислоты[56]. Он относится к факторам, ответственным за вирулентность штаммов ротавируса [25,59]. NSP4 индуцирует гуморальный иммунный ответ на ротавирусную инфекцию.

NSP4 играет важную роль в сборке вирионов ротавируса и является модулятором вирусной транскрипции [79].

У ротавирусов человека часто определяют генотипы NSP4(A) и NSP4(B) [17,84].

**NSP5** и **NSP6** кодируются одиннадцатым сегментом генома и имеют альтернативные открытые рамки считывания. Рамка считывания гена NSP6 лежит полностью внутри рамки считывания NSP5 [73]. В инфицированных клетках присутствуют оба вирусных белка, которые аккумулируются в вироплазме [39].

**NSP5** формирует димеры, которые появляются сразу после инфицирования клетки ротавирусом и могут образовывать комплекс с белками VP1 и NSP2[27,50]. Белок NSP5 проявляет свойства автокиназы и существует в инфицированных клетках в нескольких фосфорилированных изоформах [37]. Показано, что NSP5 действует как авторегулятор собственного фосфорилирования[37,78]. Вместе с другими неструктурными белками NSP5 способен перемещать некоторые вирусные белки из мест их синтеза в вироплазму, облегчать капсидацию РНК и продвигать новые вирусные частицы от вироплазмы к мембране ЭПР [64].

Белок **NSP6** взаимодействует с С-концом белка NSP5 и влияет на степень его фосфорилирования и димеризацию[39,84,86]. По сравнению с другими неструктурными белками ротавируса, он присутствует в небольших количествах, имеет самую высокую скорость обновления и полностью разрушается через 2 часа после синтеза [73]. Функции его пока не ясны, возможно, он играет несущественную регуляторную роль в ротавирусной инфекции [55].

### 1.3. Репродукция вируса

Внедрение ротавируса в клетку хозяина – многоступенчатый процесс, включающий последовательные взаимодействия с некоторыми лигандами и конформационные изменения в протеинах капсида. Начальный этап инфицирования заключается в адсорбции вируса на чувствительных к нему клетках. Было идентифицировано несколько молекул, которые являются рецепторами или ко-рецепторами ротавирусов [15,39].

Во время вирусного проникновения происходит последовательность молекулярных перестроек в белках внешнего слоя вириона [79]. Ротавирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Процесс проникновения, вероятно, напрямую зависит от эндосомальной концентрации  $Ca^{2+}$ , поскольку экспериментальное увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в эндосоме приводит к

аккумуляции интактных вирионов. После проникновения вируса через клеточную мембрану происходит его депротеинизация, в процессе которой происходят конформационные изменения структурных белков VP4 и VP7. VP7 является тримером, содержащим дисульфидные связи. После связывания вируса с мембраной и входа в клетку, низкая концентрация  $Ca^{2+}$  в эндосоме вызывает диссоциацию VP7-тримера, что приводит к высвобождению его из вириона и инициирует конформационные изменения в VP4, что в последующем приводит к высвобождению вирусных частиц в цитоплазму зараженной клетки. В цитоплазме начинают синтезироваться вирусные мРНК, которые являются точными копиями каждого сегмента генома [15].

Процесс репликации вируса проходит в цитоплазме. После удаления белков внешнего слоя активируется вирус-ассоциированная транскриптаза и начинается синтез одноцепочечных РНК позитивной полярности, которые проникают из частицы в цитоплазму. Эти одноцепочечные РНК могут функционировать как матрицы для синтеза белков вируса либо используются в качестве матриц для образования двухцепочечных геномных РНК. Репликация происходит в частицах, которые собираются из новых синтезированных вирусных белков и одноцепочечных РНК-матриц позитивной полярности. Вирусные «+»-нити РНК специфически узнаются частицами репликазы [30]. Субвирусные частицы состоят из протеиновой сердцевины (VP1 и VP2), небольшого количества протеина VP6, неструктурного белка NSP3, NSP1 и NSP2 [40]. Репликация РНК ротавирусов регулируется таким образом, что синтез полноразмерных двухцепочечных РНК идет в порядке от коротких к длинным сегментам [70]. После синтеза двухцепочечная РНК остаётся ассоциированной с субвирусными частицами. Об этом свидетельствует то, что свободная двухцепочечная РНК в клетках не найдена [38]. За синтезом двухцепочечной РНК происходит упаковка мРНК в промежуточный предшественник двухслойных частиц [15].

Особенностью репликации ротавирусов является связь с ЭПР, где осуществляется созревание и отпочковывание вирионов [42]. Однослойные частицы приобретают временную мембранную оболочку, происходящую из мембраны ЭПР, и в силу этого приобретают вирусные белки, ассоциированные с этой мембраной. В процессе созревания внутри полости ЭПР элементы временной мембранной оболочки впоследствии удаляются, и в итоге на месте мембраны остается тонкий слой белков, представляющий собой наружный капсид зрелых вирионов [83]. При этом возникают трехслойные частицы.

Механизм выхода зрелой вирусной частицы из клетки в настоящее время точно не известен. Полагают, что ротавирусы являются литическими вирусами, поэтому они способны высвободиться из клетки после её лизиса. Механизм клеточной гибели, индуцируемой ротавирусами, до конца не понятен. Возможной причиной является индукция вирусом клеточного апоптоза [39].

#### **1.4. Клинико-эпидемиологическая характеристика ротавирусной инфекции.**

Ротавирусный гастроэнтерит – острое инфекционное заболевание, протекающее с поражением слизистой оболочки тонкой кишки и ротоглотки и проявляющееся диареей, рвотой, кратковременной лихорадкой [2,4].

##### **1.4.1. Патопфизиология ротавирусной инфекции**

Ротавирусы, попадая в кишечник человека, поражают и вызывают гибель зрелых клеток тонкого кишечника, несущих на своей верхушке ворсинки. Ротавирусы устойчивы в среде желудка и протеолитические ферменты только усиливают их активность [18]. Чем дольше протекает

заболевание, тем больше зона поражения желудочно-кишечного тракта, вплоть до вовлечения в процесс толстой кишки. Зрелые эпителиальные клетки замещаются незрелыми клетками, не способными абсорбировать углеводы или другие питательные вещества. В тонкую кишку секретруется избыточное количество воды и электролитов из крови, а затем и тканей организма. Усиленная перистальтика обеспечивает быстрое поступление содержимого тонкой кишки в толстую. В ней происходит разложение не всосавшихся углеводов кишечной микрофлорой с образованием органических солей, создающих гиперосмолярность содержимого толстой кишки, усиливается приток воды в ее просвет, вызывающий диарею [2,38].

Ротавирусный гастроэнтерит как инфекционное заболевание имеет циклическое течение. Инкубационный период продолжается от 1 до 4 суток. Острый период длится от 3 до 7 суток и более при тяжелом течении болезни. Период реконвалесценции – 4-5 суток [2,9]. Возможны также и случаи хронической ротавирусной инфекции у детей с нарушениями иммунитета [20].

#### **1.4.2. Клинические проявления ротавирусной инфекции**

Ведущими симптомами ротавирусной инфекции являются интоксикация, диарея и рвота, сопровождающиеся болями в животе [2,4,39]. Для заболевания характерно острое начало с повышением температуры тела. Наиболее типичен для ротавирусного гастроэнтерита обильный водянистый пенистый стул желтого или желто-зеленого цвета. Возможно нарушение всасывания лактозы, что проявляется усилением диареи после назначения молочных продуктов. Рвота и тошнота возникают одновременно с поносом или предшествуют ему. Симптомы общей интоксикации – вялость, слабость и снижение аппетита – появляются в самом начале заболевания. Они обусловлены всасыванием в кровь токсических веществ, в частности пирогенов, образующихся вследствие гнилостного распада и

дисбактериоза. Продолжительность интоксикации у большинства детей не превышает 3-х дней [2,5,11].

Потери жидкости и электролитов вследствие рвоты и диареи могут быть значительными и приводят к развитию дегидратации. Клинические проявления дегидратации зависят от ее степени. Тяжесть течения заболевания в значительной мере определяют выраженность диареи, степень дегидратации организма, признаки токсикоза, продолжительность этих симптомов [4,32]. Для ротавирусного гастроэнтерита характерно появление симптомов поражения верхних дыхательных путей. Катаральные проявления встречаются приблизительно у 50% больных и проявляются в виде гиперемии, отечности и зернистости слизистой оболочки ротоглотки, а также ринита и диффузной гиперемии барабанной перепонки [2,5]

В связи с развитием при ротавирусном гастроэнтерите возможных осложнений, главным образом циркуляторных расстройств, острой сердечно-сосудистой недостаточности, нарушений гомеостаза, выделяют группы больных повышенного риска, в которые включают новорожденных и детей раннего возраста, лиц пожилого возраста, людей перенесших операцию по трансплантации органов, а также больных с тяжелыми сопутствующими заболеваниями или ВИЧ-инфицированных [1,91]. Описанные случаи ротавирусной инфекции с летальным исходом относятся именно к этим группам [53,65].

### 1.4.3. Иммуитет при ротавирусной инфекции

Ротавирусы обладают уникальной способностью к постоянным антигенным изменениям. При появлении новых штаммов с измененными антигенной структурой иммунитет, направленный против антигенов предшествующих штаммов, может оказаться несостоятельным [4,5]. Как симптоматическая, так и асимптоматическая ротавирусная инфекция сопровождается выработкой специфических антител. В первые дни заболевания в крови появляются IgM , в конце первой недели - IgG , спустя две недели — секреторные IgA . IgM и IgG антитела нейтрализуют вирус в жидкой фазе, IgA антитела - при попадании ротавирусов на слизистые оболочки [4,5,23,95]. Детекция IgM и IgA копроантител служит маркером недавно перенесенной ротавирусной инфекции, так как они сохраняются длительный период при отсутствии клинических проявлений болезни и выделения ротавирусов [23,31]. Было установлено, что первичная ротавирусная инфекция вызывает гетеротипический иммунный ответ [17,18,68]. Повторная ротавирусная инфекция сопровождается практически одновременным появлением в крови антител классов IgA, IgM и IgG, что является диагностическим критерием различий между первичной инфекцией и реинфицированием [18,68,95]. Повторная ротавирусная инфекция вызывает также гетеротипический иммунный ответ на новый штамм ротавируса, как и при первичной инфекции. Таким образом, иммунитет может усиливаться с каждым реинфицированием [17,18,49,68].

Так как ротавирус представляет собой сложное белковое образование, индуцируемый им иммунный ответ включает выработку антител к различным белковым антигенам. При естественной ротавирусной инфекции обнаружено появление антител не только к поверхностным белкам VP4 и VP7, но и к внутренним VP2, VP6 и неструктурным белкам NSP2, NSP4 [31,42].

Наряду с антителами существенную роль в защите организма от ротавирусной инфекции играет клеточный иммунитет. Действующими факторами клеточного иммунитета являются клетки CD8 и CD4 (цитотоксические Т-лимфоциты) [5,24,58,91]. Некоторые цитокины, в том числе  $\gamma$ -интерферон и  $\alpha$ -фактор некроза опухоли ( $\alpha$ -TNF), также могут играть важную роль в реализации антиротавирусного иммунитета [50].

#### **1.4.5. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции**

Исследования по созданию вакцин против ротавирусной инфекции начались в 80-е годы прошлого столетия. Первыми были моновалентные вакцины R1T 4237, WC 3 и RRV-1 [34]. Созданные моновалентные вакцины защищали вакцинируемого в основном от вирусов гомологичного серотипа. В связи с большой гетерогенностью популяции ротавирусов существовала необходимость создания вакцин, включающих антигены нескольких серотипов. Большие перспективы возлагались на четырехвалентную вакцину RRV-TV (RotaShield®, Wyeth Laboratories, США), разработанную на основе вакцины RRV-1 с включением сегментов РНК, кодирующих VP7 ротавирусов человека серотипов G1, G2 и G4. Вакцина RRV-TV была лицензирована в США в 1998 году, и за девять месяцев ею было вакцинировано 600 тыс. детей. У 15 из них вакцина вызвала инвагинацию кишечника (MMWR, 1999). Из-за сомнений по поводу взаимосвязи между вакциной RotaShield и инвагинацией производитель добровольно снял эту вакцину с производства.

В настоящее время прошли клинические испытания и лицензированы две живые аттенуированные ротавирусные реассортантные вакцины - RotaTeq® (Merck&Co. Inc, США) и Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия) (Dennehy P. H., 2008). Также находятся в стадии разработки или клинических испытаний еще несколько новых вакцин [50]. Эффективность

RotaTeq против гастроэнтеритов, вызванных ротавирусами тех же серотипов, что и вакцинные штаммы, составила 74,9% (серотип G1), 63,4% (G2), 82,7% (G3), 48,1% (G4). Кроме этого, данная вакцина создавала перекрестную защиту от ротавирусов серотипа G9 (65,4 %) [89]. Вакцина Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия) разработана на основе человеческого штамма RIX4414 генотипа P[8]G1, полученного из исходного штамма 89-12[22]. Вакцинный штамм обеспечивал перекрестную защиту от ротавирусов генотипов P[8]G1 (92 %) и P[8]G3, P[8]G4 или P[8]G9 (до 87 %). Защита от ротавирусов генотипа P[4]G2 проявлялась слабее (45 %). В целом вакцина Rotarix обладала 42% эффективностью в предупреждении госпитализации по поводу гастроэнтерита, вызванного ротавирусами любого генотипа [74]. Всемирное объединение по вакцинам и иммунизации (GAVI), ВОЗ и Фонд Мелинды Гейтс поддерживают скорейшее внедрение ротавирусных вакцин в беднейших странах мира, где ротавирусные инфекции считаются смертельно опасными (PATH, 2007). Многие индустриально развитые страны к настоящему времени также внедрились вакцинацию против этой инфекции.

#### **1.4.6. Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции**

Постановка диагноза ротавирусного гастроэнтерита по клинической картине, особенно при спорадической заболеваемости, представляет определенные сложности ввиду отсутствия характерных только для этой инфекции симптомов [2].

Диагностические методы при ротавирусной инфекции направлены на обнаружение цельных вирионов, вирусного антигена или вирусоспецифической РНК в фекалиях [4,5,12,82]. При проведении лабораторной диагностики предпочтение отдается методам, основанным на обнаружении вирусного антигена в фекалиях с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с моно- и поликлональными

антителами к ротавирусам; реакции латексагглютинации (РЛА) или реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) [4,5,51]. Они доступны для практических лабораторий, просты в постановке и позволяют достаточно быстро получить результат.

Очень перспективным подходом к прямому выявлению вирусов, как в клиническом материале, так и в объектах окружающей среды, является метод полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) [43,45,47]. В последние годы создаются тест-системы, основанные на современных научных разработках с комбинированием различных методов детекции ротавирусов: мультиплексная ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации "по конечной точке"; иммуно-ПЦР (IPCR) "по конечной точке" с детекцией в реальном времени; количественная ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени [10,13].

В научно-исследовательских лабораториях для быстрого выявления ротавирусов также используют электронную микроскопию [12]. При эпидемиологических исследованиях метод ОТ-ПЦР, с набором специфических для разных генотипов праймеров, применяют для идентификации штаммов ротавируса [10,57]. Обнаружение специфических антител и нарастание их титра в сыворотке крови больных и переболевших ротавирусным гастроэнтеритом при помощи серологических реакций используется для ретроспективного анализа различных эпидемиологических ситуаций [12,16,17].

В Республике Беларусь диагностика ротавирусной инфекции проводится с использованием тест-системы отечественного производства (тест-система «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

#### **1.4.7 Эпидемиологическая характеристика ротавирусной инфекции**

Ротавирусная инфекция регистрируется на всех континентах на протяжении всего года. В странах с умеренным климатом заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом повышается в холодное время года [32,83]. Во многих странах с тропическим климатом ротавирусная инфекция чаще всего встречается в течение всего года без выраженных сезонных пиков [67].

По данным литературы сезон наибольшего распространения ротавирусной инфекции в странах СНГ захватывает период с декабря по март включительно [2,4,10]. Зимне-весенняя сезонность ротавирусной инфекции характерна и для нашей страны. В возрастной структуре преобладают дети в возрасте до 5 лет, на долю которых приходится более 90% случаев ротавирусного гастроэнтерита.

В странах Европейского Союза на 23,6 миллиона детей в возрасте до 5-ти лет регистрируют 3,6 миллионов случаев ротавирусной инфекции. Ежегодно в этих странах ротавирусы являются причиной почти 700 тыс. обращений в больницу и более 87 тыс. Госпитализаций [80]. Анализ 43 исследований в 25 странах Африки показал, что там ежегодно рождается 25 млн. детей, 4,3 млн. детей умирает в возрасте до 5-ти лет, при этом причиной 850 тыс. летальных исходов является диарея. Наиболее частой этиологической причиной диареи являются ротавирусы группы А, и они ежегодно вызывают до 25 % всех госпитализаций [26]. По данным государственного санитарно-эпидемиологического надзора в РБ в 2011 и 2012 гг. было зарегистрировано 4885 (93.8% от всех заболевших ОКИ) и 3612 (69%) случаев ротавирусного гастроэнтерита среди детей в возрасте до 5 лет.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

Проанализированы данные лабораторного журнала учета результатов обследования на ротавирус детей с острым гастроэнтеритом, госпитализированных в УЗ «Городская детская инфекционная больница» (ГДИКБ) г. Минска в 2012 г. Всего в течение этого периода было госпитализировано 8195 детей с ОГЭ. Диагностика ротавирусной инфекции проводилась с использованием иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Изучено возрастное распределение (0-5 месяцев, 6-11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4-5 лет) ротавирусопозитивных образцов, сезонность, установлен показатель заболеваемости по данным госпитализации для детей различных возрастных групп.

Материалом для собственных лабораторных исследований служили образцы фекалий 65 детей с подтвержденным в ДГИКБ диагнозом ротавирусный гастроэнтерит.

Проведено повторное выявление ротавирусного антигена во всех 65 образцах методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы ProSpecT<sup>TM</sup> Rotavirus Microplate Assay (Oxoid Ltd, Великобритания).

Выполнено генотипирование 65 ротавирусов по белку VP7 наружного капсида (G-типирование) и по белку VP4 наружного капсида (P-типирование) с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР. В качестве положительного контроля в реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции использовали РНК ротавируса штамма Wa (генотип G1P[8]), предоставленных Глобальной лабораторией ВОЗ по надзору за ротавирусной инфекцией (CDC, Атланта).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1 Подготовка проб**

Начальным этапом анализа было приготовление 10% фекальной суспензии. В стерильную пробирку вносили 0,9 мл фосфатно-солевого буферного раствора и добавляли по 0,1 г плотных фекалий или 100 мкл жидких. Все пробирки маркировали. Затем тщательно перемешивали на вортексе. Далее суспензию центрифугировали в течение 5 мин при скорости ротора 3000 об/мин. Для исследований использовали надосадочную жидкость. Оставшуюся суспензию фекалий хранили при температуре 2-3 С.

### **2.2.2 Иммуноферментный анализ**

Выявление ротавирусного антигена проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы ProSpec<sup>TM</sup> Rotavirus Microplate Assay (Oxoid Ltd, Великобритания) согласно инструкции производителя.

Приготовленную 10% суспензию фекалий и контрольные образцы вносили в лунки планшеты, покрытые ротавирус-специфичными кроличьими поликлональными антителами. Далее в лунки добавляли раствор конъюгата (ротавирус-специфичные кроличьи поликлональные антитела, меченные пероксидазой хрена). Планшету инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа для связывания специфичных антител с белками ротавируса и образования комплекса антиген-антитело. После инкубации планшету промывали 5 раз промывочным буфером (фосфатный буфер), просушивали фильтровальной бумагой и в лунки планшеты вносили раствор хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), который позволяет выявлять связавшийся с иммунным комплексом конъюгат и в присутствии перекиси водорода приобретает окраску от бледно голубой до синей. Инкубировали 10 минут

при комнатной температуре. Остановку ферментативной реакции проводили стоп-реагентом (раствор серной кислоты). Оптическую плотность (ОП) окрашенного раствора в лунках измеряли с помощью спектрофотометра Multiskan EX (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Оценку результатов проводили путем сравнения значения ОП исследуемого образца и пограничного значения, которое рассчитывали следующим образом:

$$\text{Пограничное значение} = \text{ОП О.К.} + 0,200,$$

где, *ОП О.К.* – значение ОП отрицательного контроля. Если в исследуемом образце значение ОП превышало пограничное значение, это указывало на наличие ротавирусного антигена в пробе стула. Значение ОП ниже пограничного свидетельствовало об отсутствии антигена. В том случае, если значение ОП исследуемого образца находилось в рамках  $\pm 0,01$  от пограничного значения, результат расценивали как сомнительный, и образец исследовали повторно.

### **2.2.3 Выделение вирусной РНК**

Выделение РНК ротавирусов проводили с помощью автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с наборами 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) согласно инструкции производителя.

#### Выделение РНК с помощью прибора MagMAX Express

В основе работы прибора MagMAX™ Express лежит технология избирательной сорбции нуклеиновых кислот (в частности РНК) на поверхности магнитных частиц. После проведения лизиса вирусных частиц молекулы РНК в особых буферных условиях сорбируются на поверхность магнитных частиц. Данная сорбция характеризуется достаточно высокой

эффективностью. Сорбция позволяет отделить РНК от других вирусных компонентов путем переноса магнитных частиц, покрытых молекулами РНК, в новую лунку, содержащую отмывочный раствор. После серии отмывок РНК, иммобилизованная на поверхности магнитных частиц, переносится в раствор для элюции, где она переходит в раствор, а магнитные частицы удаляются.

Перенос магнитных частиц из лунки в лунку 96-луночной планшеты осуществляется прибором с помощью магнитных стержней, на которые перед работой надеваются одноразовые пластиковые наконечники. В ходе работы в лунки планшеты разливали необходимые растворы и реагент с магнитными частицами, добавляли 10% суспензию фекалий исследуемых проб. Помещали планшету в прибор, где проводились необходимые этапы инкубации, отмывки, сушки и элюции.

Выделенную РНК переносили в эппендорфы, которые предварительно были промаркированы, и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.2.4 Полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции**

Полимеразную цепную реакцию со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводили в один раунд с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Германия), содержащего смесь ферментов: обратные транскриптазы Omniscript и Sensiscript и HotStarTaq ДНК полимеразу. Для постановки реакции готовили смесь праймеров и смесь, содержащую ферменты, в соответствии с протоколом, представленным в таблице 1.

В каждую пробирку вносили по 3 мкл смеси праймеров и 4 мкл РНК соответствующей пробы, выдерживали 4 мин при температуре  $97^{\circ}\text{C}$  для денатурации вирусной РНК. Затем в пробирку добавляли по 23 мкл реакционной смеси, содержащей ферменты (табл.1) и проводили реакцию в

следующих условиях: цикл обратной транскрипции в течение 30 мин при 42<sup>0</sup>С, 15 минут при 95<sup>0</sup>С для денатурации смеси обратных полимераз и активации полимеразы и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал следующие стадии: денатурация при 94<sup>0</sup>С – 30 секунд, отжиг праймеров при 42<sup>0</sup>С – 30 секунд, элонгация при 72<sup>0</sup>С – 45 секунд. В последнем цикле элонгацию проводили 4 мин.

Таблица 1 – Компоненты смесей для проведения ОТ-ПЦР

<u>Р-типирование</u>		<u>G-типирование</u>	
<i>Приготовление смеси праймеров</i>			
праймер	объем для одной пробы (мкл)	Праймер	объем для одной пробы (мкл)
Con2 primer (20 мМ)	1,5	9con1-L (20 мМ)	1,5
Con3 primer (20 мМ)	1,5	VP7 R (20 мМ)	1,5
<i>Приготовление смеси с ферментом</i>			
компонент смеси	объем для одной пробы (мкл)	компонент смеси	объем для одной пробы (мкл)
H <sub>2</sub> O	16	H <sub>2</sub> O	16
Буфер (10x)	5	Буфер (10x)	5
дНТФ (10 мМ)	1	дНТФ (10 мМ)	1
Смесь ферментов	1	Смесь ферментов	1

### 2.2.5 Мультиплексная ПЦР

Состав реакционной смеси для второго раунда ПЦР (мультиплексной) представлен в табл. 2 и 3. Для проведения G-типирования использовались 2 варианта набора праймеров.

Добавляли в каждую пробирку по 48 мкл смеси и затем вносили по 2 мкл соответствующего продукта, полученного в ОТ-ПЦР.

Реакция проходила при следующих условиях: проводили 30 циклов, включающих денатурацию при 94<sup>0</sup>С – 45 секунд, отжиг праймеров при 42<sup>0</sup>С – 30 секунд, элонгацию при 72<sup>0</sup>С – 1 мин. В последнем цикле элонгацию проводили 7 мин.

Таблица 2– Компоненты смеси для проведения 2-го раунда ПЦР для R-типирования.

Компонент смеси	Объем для одной пробы (мкл)
H <sub>2</sub> O	28,5
Буфер (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	4
дНТФ (10 мМ)	2
Con3 (20 мМ)	1
1T1 (20 мМ)	1
2T1 (20 мМ)	1
3T1 (20 мМ)	1
4T1 (20 мМ)	1
5T1 (20 мМ)	1
jrg237 (20 мМ)	1
1T1-V (20 мМ)	1
Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5

Таблица 3 – Компоненты смеси для проведения 2-го раунда ПЦР для G-типирования.

1 вариант		2 вариант	
компонент смеси	объем для одной пробы (мкл)	компонент смеси	объем для одной пробы (мкл)
H <sub>2</sub> O	29,5	H <sub>2</sub> O	29,5
Буфер (10x)	5	Буфер (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	4	MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	4
дНТФ (10 мМ)	2	дНТФ (10 мМ)	2
9con1-L (20 мМ)	1	VP7R (20)	1
9T1-DG (20 мМ)	1	aBT1 (20 мМ)	1
9T1 (20 мМ)	1	aCT2 (20 мМ)	1
9T2 (20 мМ)	1	aET3 (20 мМ)	1
9T3P (20 мМ)	1	aDT4 (20 мМ)	1
9T4 (20 мМ)	1	aAT8 (20 мМ)	1
9T9B (20 мМ)	1	aFT9 (20 мМ)	1
Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5	G12B (20 мМ)	1
		Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5

В исследовании были использованы праймеры, описанные в литературе[43].

## 2.2.6 Анализ продуктов амплификации

Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле в трис-ацетатном буфере с pH 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением красителя Gelstar 10000X (Lonza, США). Для этого 10 мкл ПЦР-продукта смешивали с 2 мкл буфера для нанесения проб (0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилен цианола, 30% глицерола) и вносили в лунки геля. Для контроля размера синтезированных фрагментов использовали молекулярно-весовой маркер ДНК 1kb Plus (Invitrogen, Бельгия). Электрофорез проводили при 115В в течение 1,5 часа. ДНК фрагменты идентифицировали в ультрафиолетовом излучении с использованием трансиллюминатора ( $\lambda$ -310 нм). Учет проводили по появлению специфической полосы на расстоянии, соответствующем длине пробега синтезируемого фрагмента ДНК.

## 2.3. Методы статистической обработки полученных данных

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью параметрических методов с использованием компьютерной программы MS Excel. Полученные в результате исследования данные были собраны в таблицах базы данных MS Excel. Дальнейшая обработка данных проводилась преимущественно в этой же программе.

Ошибку относительного показателя определяли по формуле:

$$m = \sqrt{\frac{P \times q}{n}}$$

где  $P$  - показатель, выраженный в %,  
 $q = (100 - P)$ , при  $P$  выраженном в %,  
 $n$  – объем выборки;

Заболеваемость на 1000 населения рассчитывали по формуле:

**(число новых случаев / среднегодовое население) × 1000**

### ГЛАВА 3

#### Анализ госпитализированных случаев ротавирусных гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012 г

По данным ГДИКБ г. Минска, которая является практически единственным стационаром для лечения больных ОКИ детей столицы, в 2012г. на ротавирусную инфекцию было обследовано 8195 детей с острым гастроэнтеритом (ОГЭ). В пробах стула 1556 из обследованных методом иммуноферментного анализа был обнаружен антиген ротавируса, таким образом, в  $19,0\pm 0,4\%$  случаев именно гастроэнтерит ротавирусной этиологии послужил причиной госпитализации в стационар детей с ОГЭ (таблица 4).

Таблица–4. Количество случаев ОГЭ ротавирусной этиологии в различных возрастных группах в 2012г. в г. Минске

Возраст	Число обследованных на РВИ	Число ротавируспозитивных	% ротавируспозитивных в возрастной группе
0-5 мес.	982	174	$17\pm 1\%$
6-11мес.	1230	308	$25\pm 1,2\%$
12-23 мес.	2 079	576	$27,7\pm 0,1\%$
2г.-2г.23мес.	1163	227	$19,5\pm 1\%$
3г-3г.23мес.	1062	123	$11,6\pm 0,9\%$
4г.-5лет	846	88	$10,4\pm 1\%$
6-9лет	536	39	$7,3\pm 1\%$
10-14лет	203	13	$6,4\pm 1,7\%$
старше14лет	94	8	$8,5\pm 2,8\%$
<b>итого</b>	<b>8195</b>	<b>1556</b>	<b><math>19\pm 0,4\%</math></b>

Подавляющее большинство детей с ОГЭ были в возрасте 0-5 лет (7372), что составило около  $90,0\pm 0,3\%$  от числа всех госпитализированных с ОГЭ детей за анализируемый период времени (рисунок 2). Ротавирусная инфекция была лабораторно подтверждена у 1496 ( $20,3\pm 0,4\%$ ) детей этого возраста. Поскольку, в соответствии с рекомендациями ВОЗ [93], эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией должен быть в основном сосредоточен на лицах данной возрастной группы, дальнейший анализ эпидемиологических

характеристик инфекции был выполнен в отношении детей в возрасте 0-5 лет.

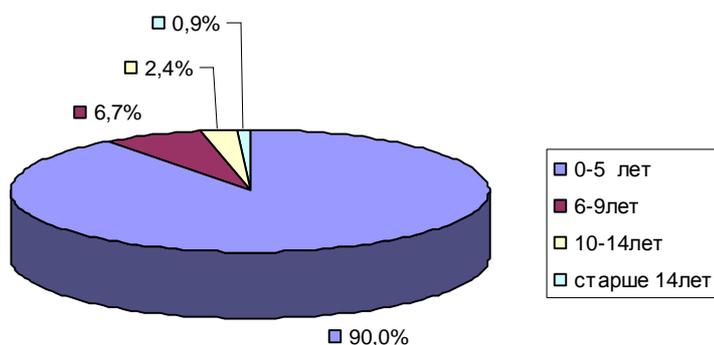


Рисунок 2– Частота встречаемости случаев ОГЭ у детей различных возрастных групп в г. Минске в 2012г, потребовавших госпитализации в ДИКБ

Исходя из данных анализа лабораторно подтвержденных случаев, ротавирусный ОГЭ у детей в г. Минске в 2012г. характеризовался зимне-весенней сезонностью. Позитивные на ротавирус образцы регистрировались в течение всего года, однако наиболее высокий их удельный вес был выявлен в период с января по май (январь –  $32,6 \pm 0,5\%$ , февраль –  $27,8 \pm 0,5\%$ , март –  $30,8 \pm 0,5\%$ , апрель –  $29,3 \pm 0,5\%$ , май –  $22,5 \pm 0,4\%$ ). В течение этого периода было выявлено 1052 из 1496 случаев ротавирусной диареи, что составило более 70% от общего количества ротавирусопозитивных проб, выявленных в течение всего 2012г. Выявление ротавирусопозитивных образцов в межсезонный период составляло от  $7,5 \pm 0,3\%$  в октябре до  $18,3 \pm 0,4\%$  в июне (рисунок 3).

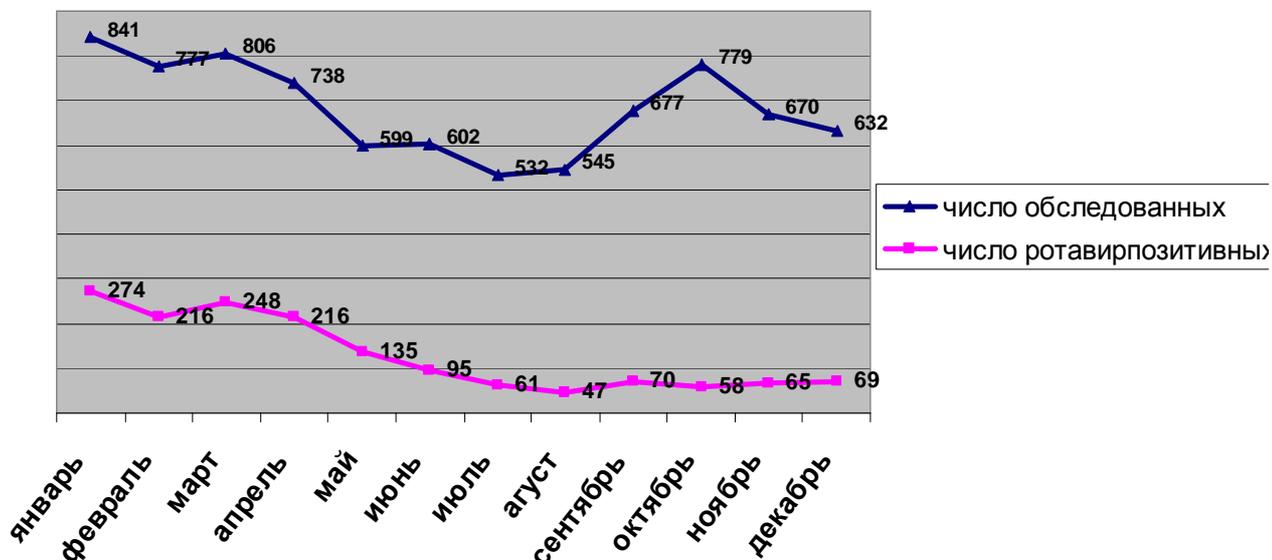


Рисунок 3– Сезонная структура заболеваемости РВИ в г.Минске в 2012г

Полученные нами данные согласуются с данными литературы, согласно которым в странах с умеренным климатом заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом повышается в холодное время года [32,83] и захватывает период с декабря по май включительно [3,4,10].

Более 70% (1058) от всех ротавирусных гастроэнтеритов, выявленных у детей 0-5 лет, пришлось на долю детей в возрасте 0-1 год (рисунок 4). Среди лиц первого года жизни ротавирусная инфекция достоверно реже ( $p < 0,05$ ) регистрировалась у детей 0-5 месяцев в сравнении с детьми 6-11 месяцев. Среди 982 госпитализированных детей в возрасте 0-5 месяцев антиген ротавируса был выявлен в образцах стула в  $17 \pm 1\%$  случаев, тогда как у 1230 детей 6-11 мес. в  $25 \pm 1\%$  случаев (174 случая ротавирусного гастроэнтерита было выявлено в возрастной группе 0-5 мес. и 308 случаев в возрасте 6-11 мес.). Исходя из литературных источников более низкие показатели заболеваемости у детей в возрасте до 6 мес. могут быть связаны с бессимптомным течением инфекции среди младенцев первых месяцев жизни, наличием защитных материнских антител и физиологической незрелостью кишечника детей данного возраста [23,26].

В возрастной группе 0-1 год наибольший вклад в заболеваемость внесли дети 12-23 месяцев. Среди 2079 госпитализированных детей данного возраста антиген ротавируса был выявлен в образцах стула в  $27\pm 0,1\%$  случаев (576 случая ротавирусного гастроэнтерита).

Удельный вес детей старше 2 лет был существенно более низким и составил в возрасте 2 лет  $15,1\pm 1\%$  (227 случаев), 3 лет –  $8,2\pm 0,8\%$  (123 случая), 4-5 лет –  $5,9\pm 0,7\%$  (88 случаев).

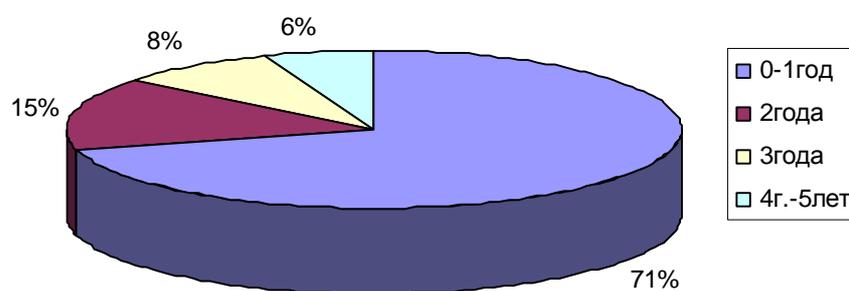


Рисунок 4– Возрастная структура заболеваемости РВИ детей в возрасте 0-5 лет в 2012г. в г. Минске

Преимущественное вовлечение в эпидемический процесс детей в возрасте до 2 лет отмечалось в течение всего года, как в сезонный подъем, так и в межсезонный период. Так в январе-мае (сезонный подъем) данной возрастной группой было обусловлено более 70% всех случаев ротавирусной диареи, зарегистрированной в соответствующий период (752 случая ротавирусного гастроэнтерита из 1052, выявленных в сезонный подъем). Существенный вклад в общую структуру заболеваемости дети до 2 лет внесли и в межсезонный период, в котором было выявлено 306 случаев гастроэнтерита ротавирусной этиологии из 444 ротавирусопозитивных проб, зарегистрированных в июне– декабре (рисунок 5) .

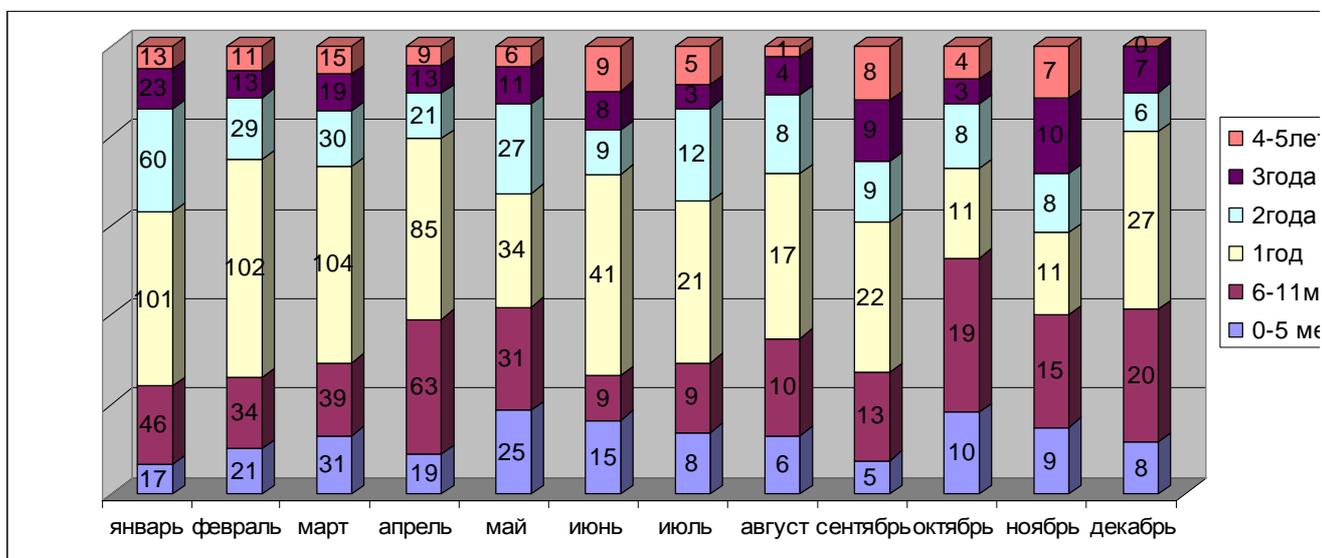


Рисунок 5– Возрастное распределение случаев РВИ в течение года

Частота встречаемости госпитализированных случаев ротавирусных ОГЭ (т.е. заболеваемость по данным госпитализации) в г. Минске в 2012 г. в расчете на 1000 детей возрастной когорты составила 20,0 среди детей до года (высокий показатель обусловлен в первую очередь за счет детей 6-11 месяцев), 17,0 – среди детей 1 года, 9,6 – среди детей 2 лет, 5,25 – среди детей 3 лет и 2,0 – среди детей 4-5 лет. В целом в возрастной когорте 0-5 лет частота встречаемости госпитализированных случаев ротавирусных ОГЭ составила 10,8 на 1000(таблица 5).

Таблица– 5. Частота госпитализированных случаев РВИ, рассчитанная на 1000 населения возрастной когорты

Возраст	Число выявленных больных РВИ	Численность населения данной возрастной когорты	Частота госпитализированных случаев на 1000 населения
до 1 года	482	24104	20
1 год	402	23671	17
2 года	227	23585	9,6
3 года	123	23409	5,3
4-5 лет	88	43930	2

Согласно данным официальной регистрации, в Республике Беларусь ежегодно выявляется от нескольких сотен до несколько тысяч заболевших ротавирусной инфекцией (от 637 в 1995 г. (год начала регистрации заболеваемости) до 5203 в 2011 г.). Из них число случаев инфекции, выявленных в г. Минске, составляло от 547 в 1995 г. до 2725 в 2011 г. Подавляющее большинство заболевших – это дети в возрасте от 0 до 2 лет.

По сравнению с предыдущими двумя годами число зарегистрированных случаев ротавирусной инфекции в г. Минске в 2012 г. существенно снизилось. По данным Минского городского ЦГЭ в 2010-2011 гг. было выявлено 2654 и 2725 случая гастроэнтерита ротавирусной этиологии соответственно, что более чем в 1,5 раза превышает показатели 2012г. (рисунок 6).

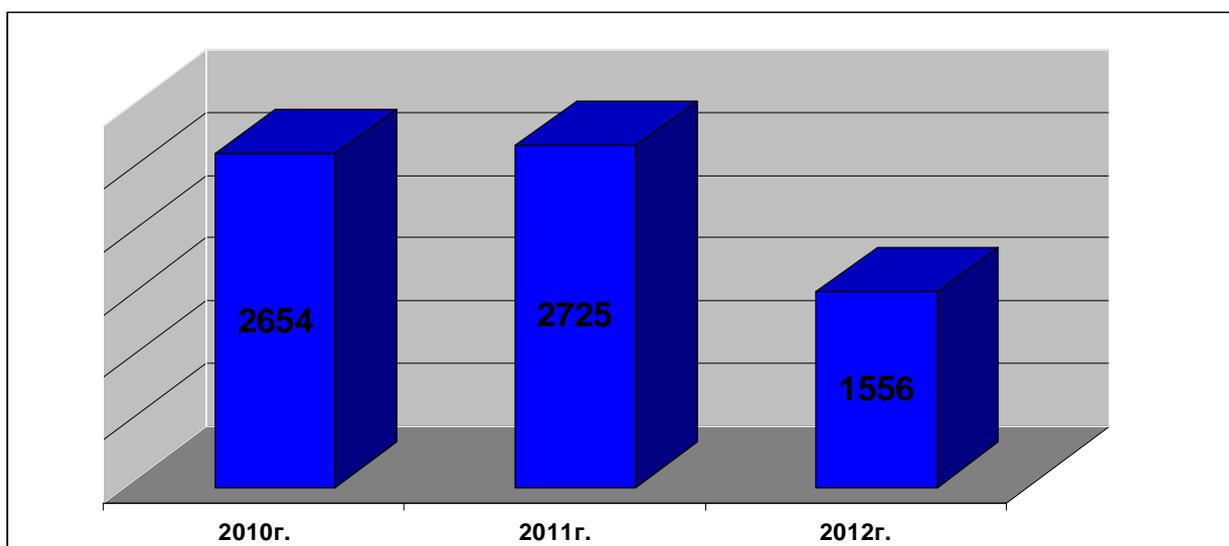


Рисунок 6– Число зарегистрированных случаев РВИ у детей в г. Минске в 2010-2012 гг

Сравнение полученных нами данных с данными литературы показывает, что частота встречаемости ОГЭ ротавирусной этиологии среди других госпитализированных диарейных заболеваний ( $20,3 \pm 0,4\%$ ) в 2012 г. в г. Минске была несколько ниже в сравнении со странами Европейского региона ВОЗ, в которых при поддержке Европейского регионального бюро ВОЗ осуществляется дозорный эпидемиологический надзор за ротавирусами

(Армения, Азербайджан, Грузия, Молдова, Таджикистан, Украина). Средняя частота встречаемости ротавирусных диарей в этих странах в 2011-2012 гг. составила 41% [94]. По данным ВОЗ, наиболее высокая частота ротавирусных ОГЭ отмечалась в странах Западно-Тихоокеанского региона (43%) и региона Юго-Восточной Азии (43%), самая низкая – в странах Американского региона (24%) [94].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что ротавирусная инфекция являлась достаточно частой причиной госпитализации детей в инфекционный стационар. У детей в возрасте 0-5 лет, госпитализированных по причине ОГЭ, ротавирусная этиология заболевания была лабораторно подтверждена в  $20,3 \pm 0,4\%$  случаев.

Ротавирусный гастроэнтерит характеризовался зимнее-весенней сезонностью и преимущественным вовлечением в эпидемический процесс детей в возрасте 0-1 год.

Бремя ротавирусной инфекции в г. Минске является существенным. Число госпитализированных случаев ОГЭ ротавирусной этиологии среди детей 0-5 лет составило 10,8 на 1000 детей данной возрастной группы, и была наиболее высокой у детей в возрасте до года и 1 года (20,0 на 1000 и 17,0 на 1000 соответственно). При этом следует учитывать, что в целом в 2012 г. уровень заболеваемости ротавирусной инфекцией в г. Минске был существенно ниже, чем в предыдущие годы (2010, 2011).

Как известно, повышение контроля качества воды и продуктов питания не приводит к существенному снижению заболеваемости, обусловленной ротавирусами. Единственным достаточно эффективным способом контроля этой инфекции является вакцинация. Полученные данные имеют большое значение для оценки потребности Республики Беларусь в ротавирусной вакцине.

## ГЛАВА 4

### Генетическое разнообразие ротавирусов, циркулировавших в г. Минск в 2012г

Материалом для изучения генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих в г. Минске в 2012г., являлись пробы стула детей с лабораторно подтвержденным диагнозом РВИ, госпитализированных в ГДИКБ г. Минска.

Для определения генетического пейзажа ротавирусов были отобраны для исследования в мультиплексной ОТ-ПЦР пробы стула пропорционально количеству случаев заболевания, зарегистрированных в каждом месяце (рисунок 7). Всего было взято 65 проб: январь – 11, февраль – 10, март – 8, апрель – 8, май – 6, июнь – 4, июль – 2, август – 5, сентябрь – 4, октябрь – 4, ноябрь – 1, декабрь – 3.

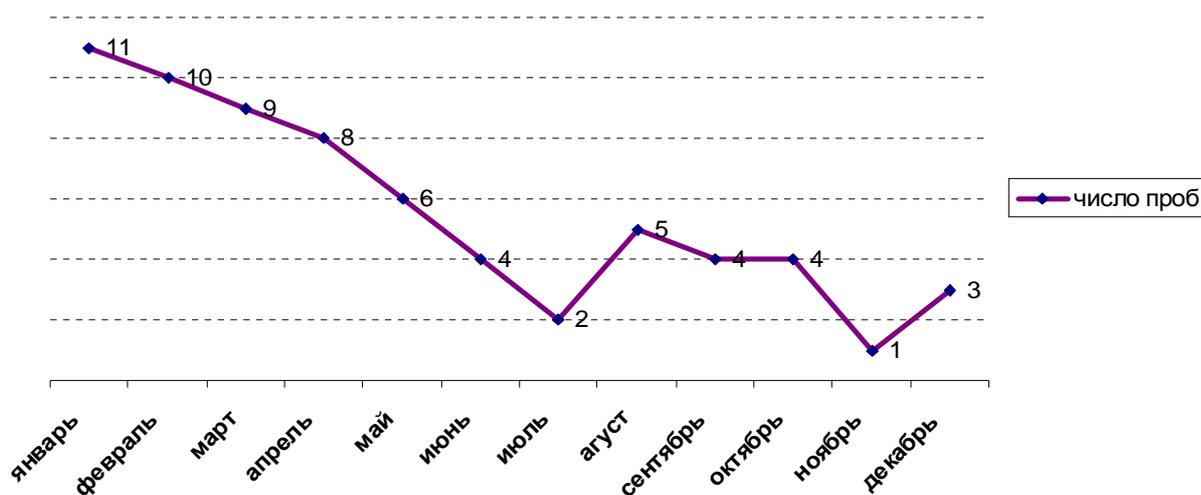


Рисунок 7– Распределение отобранных для исследования в мультиплексной ОТ-ПЦР проб по месяцам

Перед постановкой мультиплексной ПЦР все отобранные образцы были предварительно исследованы с использованием иммуноферментной

тест-системы ProSpecT Rotavirus Microplate Assay (Oxoid Ltd, Великобритания).

Результаты генотипирование ротавирусов, проведенного по двум генам, кодирующим белки VP4 и VP7 наружного капсида, показали, что популяция циркулирующих ротавирусов характеризовалась разнообразием. В 65 исследуемых пробах в различных сочетаниях были выявлены 2 Р- и 5 G-генотипов ротавируса.

Так, среди Р-генотипов преобладающим оказался генотип P[8], удельный вес которого составил  $93,5 \pm 3\%$  (данный генотип был обнаружен в 60 образцах проб из 65 исследуемых). Вторым выявленным Р генотипом был генотип P[4], обнаруженный лишь в 5 пробах ( $6,5 \pm 3\%$ ). Полученные нами данные соответствуют литературным источникам, согласно которым, наиболее часто встречающимися и повсеместно распространенными Р-генотипами являются варианты P[8] и P[4]. Однако следует отметить, что в последние годы в некоторых регионах мира (Индия, Китай, Латинская Америка) такие генотипы, как P[6], P[9], P[10] также имеют эпидемическое значение и выявляются там с большей частотой [29,72].

Среди G-генотипов наиболее распространенным в г. Минске оказался генотип G4, идентифицированный в 36 пробах и составивший  $55,4 \pm 6\%$  от общего количества выявленных G-вариантов. Вторым по частоте встречаемости был G3, обнаруженный в 14 образцах исследуемого материала, удельный вес которого составил  $21,5 \pm 5\%$ . Достаточно часто выявлялся и генотип G1 ( $12,3 \pm 4\%$ ). Значительно реже встречались вирусы генотипов G2 ( $6,2 \pm 2,9\%$ ) и G9 ( $4,6 \pm 2,5\%$ ).

Поскольку гены, кодирующие два связанных с нейтрализацией протеина, VP7(G) и VP4(P), расщепляются независимо, современная классификация ротавирусов учитывает характеристику обоих этих генов. В г. Минске в 2012 г. были распространены 5 генетических G-P вариантов ротавируса, которые были представлены пятью G-типами (G4, G3, G2, G1, G9) и двумя Р-типам (P[8], P[4]). Наибольший вклад в заболеваемость внес генотип G4P[8],

к которому относились 36 из 65 исследуемых образцов ( $55,4\pm 6\%$ ). На втором месте по частоте встречаемости находился генотип G3P[8], обнаруженный в 14 образцах ( $21,5\pm 5\%$ ). Генотипы G1P[8] и G2P[4] занимали третье и четвертое место соответственно ( $12,3\pm 4\%$  и  $6,2\pm 2,9\%$ ). Генотип G9P[8] был выявлен только в трех образцах стула ( $4,6\pm 2,4\%$ ) (рисунок 8).

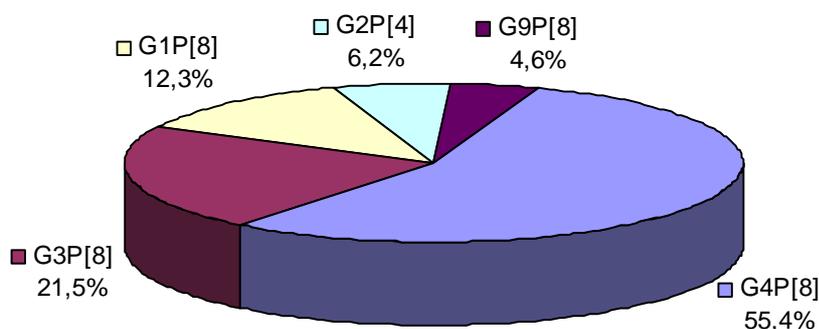


Рисунок 8–Вклад различных генотипов в этиологическую структуру заболеваемости РВИ в г.Минске в 2012г

Пейзаж циркулирующих в 2012 г. ротавирусов не являлся постоянным в течение всего года. Так, ротавирус генотипа G3P[8] преимущественно циркулировал в первой половине года. Этим генотипом было обусловлено  $27,1\pm 5,5\%$  случаев ОГЭ, выявленных в период с января по июнь, и только  $5,9\pm 2,9\%$  гастроэнтеритов, выявленных во второй половине года. В то же время циркуляция ротавируса генотипа G1P[8] активизировалась, начиная со второй половины года, и увеличилась по сравнению с первой почти в три раза. На долю этого генотипа пришлось  $8,3\pm 3,4\%$  ротавирусных ОГЭ первой половины года и  $23,5\pm 5,2\%$  второй половины года. При этом ротавирус генотипа G4P[8] сохранял свои лидирующие позиции на протяжении всего года (рисунок 9).

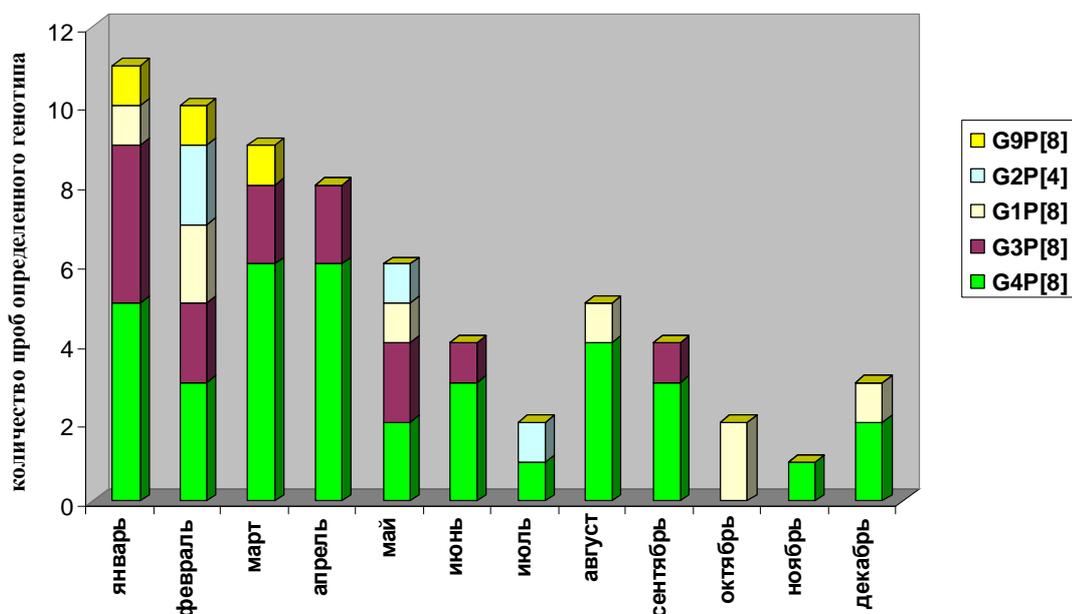


Рисунок 9– Сезонное распределение различных генотипов ротавируса, циркулирующих в г. Минске в 2012г

Важно было оценить, произошло ли в 2012 г. изменение пейзажа ротавирусов, циркулировавших в г. Минске, в сравнении с предыдущими годами. Сравнение полученных данных с результатами мониторинга циркуляции ротавирусов 2008-2011 гг., выполненных лабораторий вакциноуправляемых инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и являющейся Региональной референс-лабораторией ЕРБ ВОЗ по ротавирусам, показало, что хоть генотип Р[8] и являлся доминирующим в течение всех четырех лет наблюдения, его доля в популяции циркулировавших ротавирусов значительно изменялась: так в 2008г. удельный вес данного генотипа составил 91,9%, в 2009г. этот показатель снизился до 68,5 %, в 2010г. его доля снова стала увеличиваться и к 2012г. достигла 95,5%. Доля генотипа Р[4], который в 2008г. выявлялся в единичных случаях, выросла более чем в 11 раз в 2009г. Однако уже в последующие два года отмечалось значительное снижение частоты его встречаемости до 11,9% и 3% в 2010 и 2011гг., соответственно. Не произошло существенных изменений и в 2012г. - удельный вес генотипа Р[4] составил 6,2%. Генотипы Р[6] и Р[9] не имели широкого распространения и в предыдущие четыре года наблюдения и были

представлены в популяции ротавирусов г. Минска единичными образцами (рисунок 10).

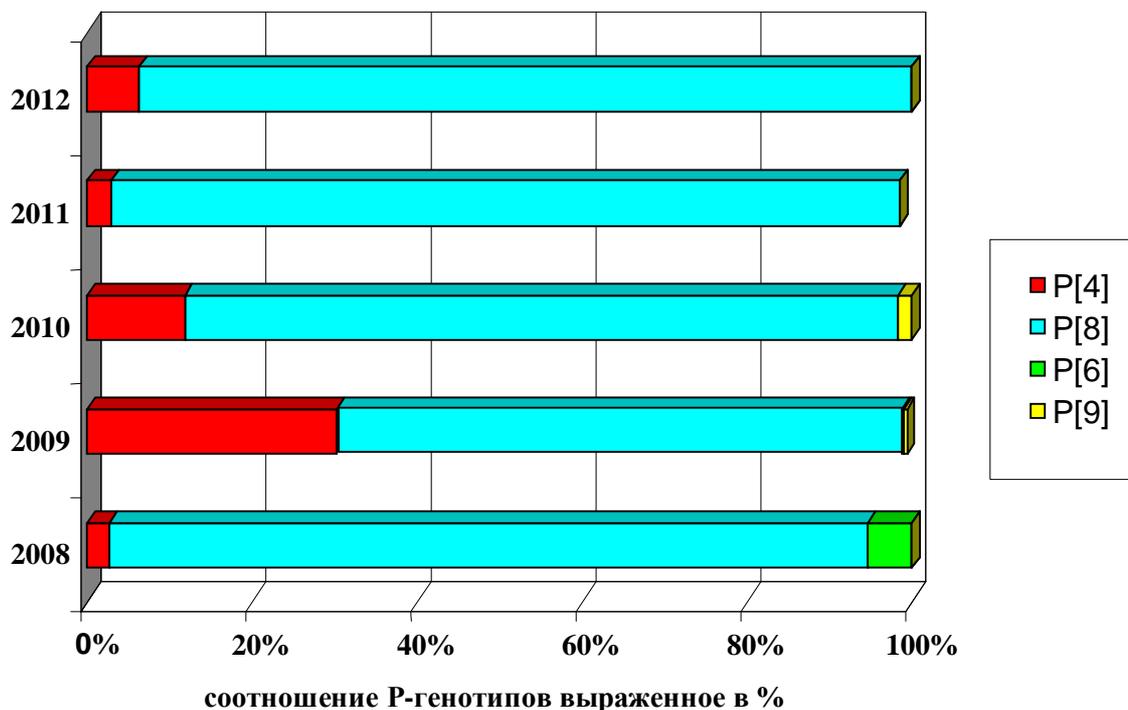


Рисунок 10–Соотношение Р-генотипов ротавирусов в 2008-2012гг. в г. Минске

Среди G-генотипов лидирующие позиции на протяжении 2008-2009 гг. занимал генотип G4, доля которого в циркуляции составляла 56,4% и 64,9%, соответственно. Однако, начиная с 2010г. отмечалось его вытеснение вирусами генотипа G3, доля которых составила 39,7% в 2010 г. и 68,6% в 2011 г. В 2012г. генотип G4 снова возвращает свою доминирующую позицию и составляет  $54,5 \pm 6\%$  среди всех G-генотипов.

Вклад в заболеваемость внесли также ротавирусы генотипов G1, G2 и G9. В течение периода наблюдения отмечались незначительные колебания занимаемой ими доли. Так, доля генотипа G1 варьировала в пределах 4,5 – 12,3% (2009-2012 гг.), и только в 2008 г. составила 21,9%. Похожая картина наблюдалась и в отношении генотипа G2: максимум был зарегистрирован в 2009 г. и составил 30,1%, тогда как в остальные годы не превышал 12,1%.

Вирусы генотипа G9 в течение 2008-2011гг. практически не выявлялись и в 2012г. составили  $4,6 \pm 2,4\%$  (рисунок 11).

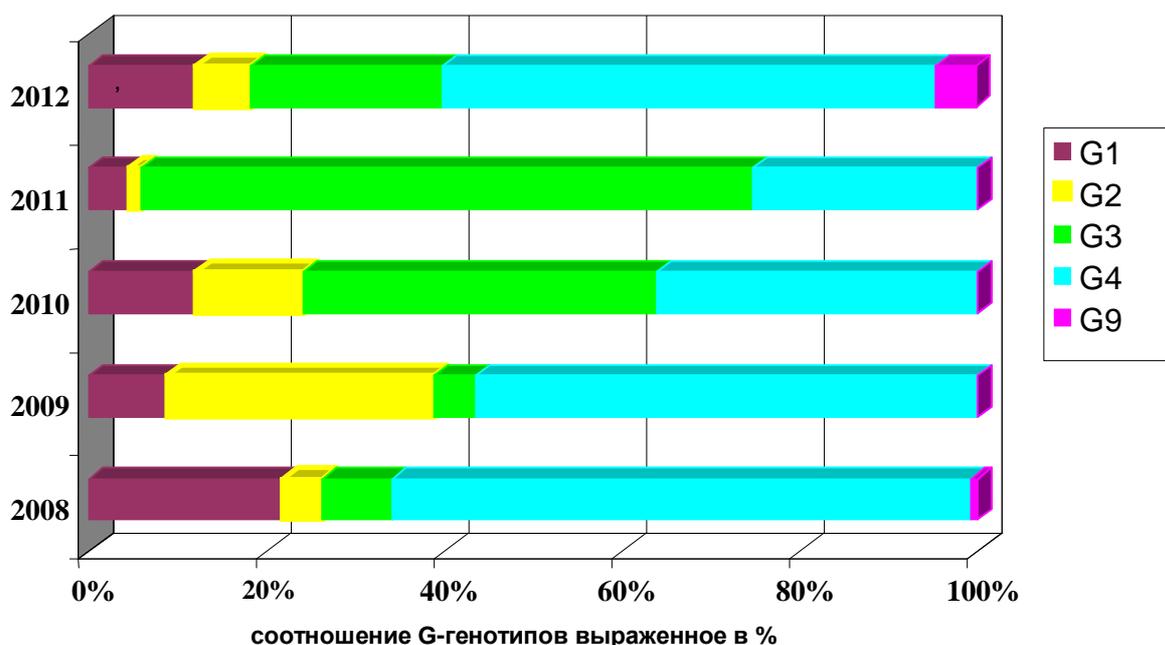


Рисунок 11–Соотношение G-генотипов ротавирусов в 2008-2012гг. в г. Минске

Если проанализировать G-P комбинации ротавирусов, циркулировавших в г. Минске с 2008 г. по 2012 г., то имеется следующая картина генотипического разнообразия (рис.12). Ротавирус генотипа G4P[8], являвшийся доминирующим в 2008-2009гг. (60,4% и 56% соответственно) и несколько утративший свои позиции в 2010-2011г. (36,2% и 24,3% соответственно), в 2012г. опять вышел на первое место в структуре возбудителя и составил  $55,4 \pm 6\%$  среди всех выявленных генотипов. Удельный вес генотипа G3P[8], доминировавшего в 2011 г., снизился с 66,7% до 21,5%. Доля генотипа G1P[8], который считается наиболее широко распространенным в мире, в 2012 г. в сравнении с 2011 г. несколько выросла (с 4,4% до 12,3%), однако, по-прежнему удельный вес этого генотипа продолжает оставаться невысоким. Следует отметить, что ротавирусы генотипа G9P[8] встречаются в Республике Беларусь редко (по одному

образцу было выявлено в 2008 и 2010 г., 3 образца – в 2012 г), хотя частота обнаружения этого генотипа вируса в мире растет [94](рисунок 12)

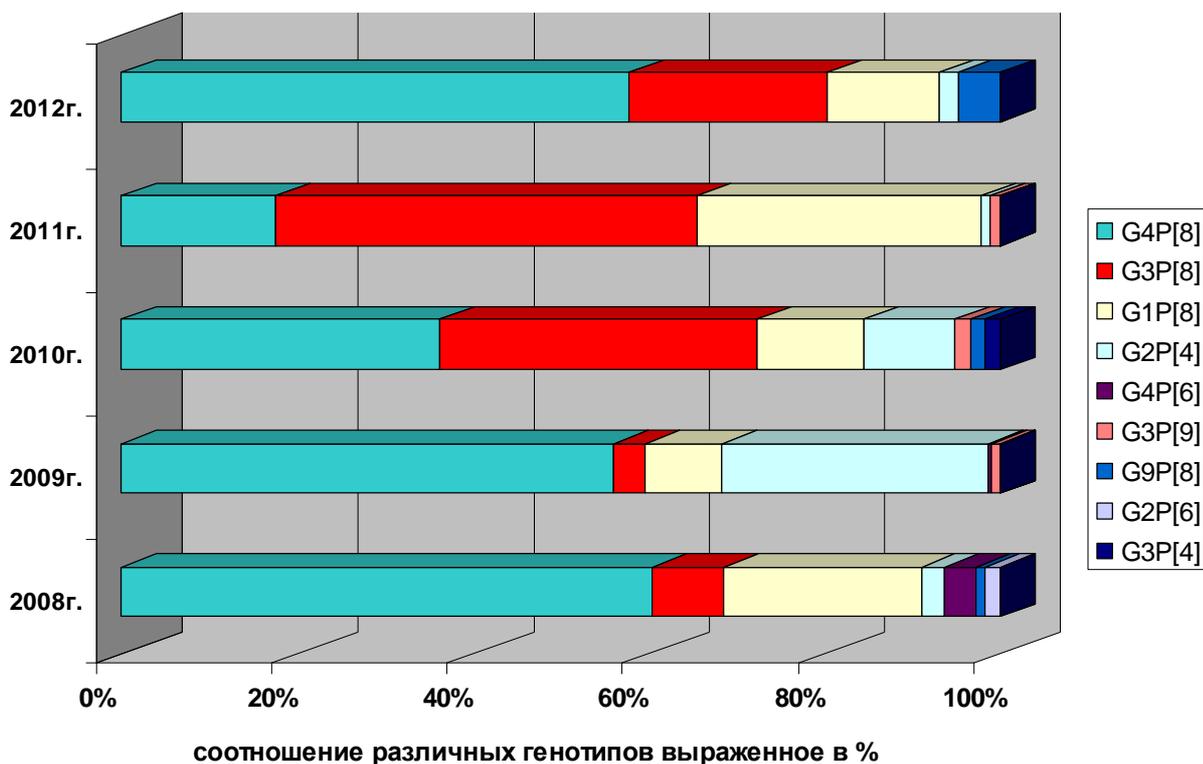


Рисунок 12–Сравнительный анализ генотипов ротавирусов, циркулировавших в г. Минске с 2008 по 2012 гг

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что генотипический полиморфизм ротавирусов, периодическая смена доминирующих штаммов возбудителя обуславливают необходимость систематического молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции ротавирусов. Такой мониторинг позволяет определить спектр циркулирующих штаммов, доминирующие генотипы, своевременно отслеживать их смену, осуществлять прогнозирование эпидемической ситуации.

Проведенное генотипирование ротавирусов по G и P генам с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР показало, что пейзаж ротавирусов, этиологических агентов диареи у детей в г. Минске в 2012 г.,

являлся многообразным и был представлен ротавирусами пяти G (G4, G3, G1, G2, G9) и двух P (P8, P4) типов, которые формировали пять G-P сочетаний - G4P[8] (55,4±6%), G3P[8] (21,5±5%), G1P[8] (12,3±4%), G2P[4] (6,2±2,9%) и G9P[8] (4,6±2,4%).

Ротавирус генотипа G4P[8] являлся преобладающим на протяжении всего года. Ротавирус генотип G3P[8] преимущественно циркулировал в первой половине года. Циркуляция ротавируса генотипа G1P[8] активизировалась, начиная со второй половины года. Ротавирусы генотипов G2P[4] (6,2±2,9%) и G9P[8] (4,6±2,4%) встречались редко и, в основном, только в период сезонного подъема заболеваемости.

## Выводы

1. Среди госпитализированных в 2012 г. в ДИКБ г. Минска 8195 детей с острой диареей 7372 ( $90,0 \pm 0,3\%$ ) составили дети в возрасте 0-5 лет. Проведенное с помощью иммуноферментного анализа исследование обнаружило антиген ротавируса в образцах стула у 1496 из 7372 ( $20,3 \pm 0,4\%$ ) детей этого возраста. Более 70% (1058) от всех ротавирусных гастроэнтеритов, выявленных у детей 0-5 лет, пришлось на долю детей в возрасте 0-1 год. Удельный вес детей 2 лет и старше был существенно более низким и составил в возрасте 2 лет  $15,1 \pm 0,1\%$  (227 случаев), 3 лет –  $8,2 \pm 0,8\%$  (123 случая), 4-5 лет –  $5,9 \pm 0,7\%$  (88 случаев). Показатель заболеваемости ротавирусными ОГЭ по данным госпитализации на 1000 детей в возрасте 0-5 лет в г. Минске в 2012 г. составил 10,8 и был наиболее высоким среди детей в возрасте до года и 1 года (20,0 на 1000 и 17,0 на 1000, соответственно).

2. Позитивные на ротавирус образцы выявлялись в течение всего года. Наиболее высокий удельный вес позитивных образцов (от 22,5 до 32,8%) отмечался с января по май (с сезонным пиком в январе и марте). В течение этого периода было выявлено 1052 из 1496 (70,0%) случаев ротавирусного гастроэнтерита. Выявление ротавирусопозитивных образцов в межсезонный период составляло от  $7,5 \pm 0,3\%$  (октябрь) до  $18,3 \pm 0,4\%$  (июнь). Преимущественное вовлечение в эпидемический процесс детей в возрасте 0-1 год отмечалось в течение всего года

3. Выполненное генотипирование 65 ротавирусов, обнаруженных в образцах стула детей, по генам, кодирующим структурные белки VP7 и VP4, показало, что в 2012 г. вклад в заболеваемость острыми гастроэнтеритами у детей в г. Минске внесли пять генотипов ротавирусов – G4P[8] ( $55,4 \pm 6\%$ ), G3P[8] ( $21,5 \pm 5\%$ ), G1P[8] ( $12,3 \pm 4\%$ ), G2P[4] ( $6,2 \pm 2,9\%$ ) и G9P[8] ( $4,6 \pm 2,4\%$ ).

Пейзаж циркулировавших ротавирусов не являлся постоянным в течение всего года. Сезонный подъем заболеваемости формировался за счет всех пяти генотипов (G4P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4], G9P[8]), тогда как в межсезонный период циркулировали преимущественно вирусы генотипов G4P[8] и G1P[8].

## Список литературы.

1. Анисимова Ю.Н., Цинзерлинг А.В. Дзюблик И.В. Инфекционно-токсический шок при генерализованной ротавирусной инфекции у новорожденных // Архив патологии. - 1993. - Т. 55. - № 5- С. 32-38.
2. Богомолов Б.П. Острые кишечные инфекции // Инфекционные болезни: неотложная диагностика, лечение, профилактика // Ньюдиамед, Москва. - 2007.-С. 129-615
3. Буркин А.В., Харченко Г.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика острых кишечных инфекций у детей Нижнего Поволжья // ЖМЭИ - 2006. - № 1. - С. 69-72.
4. Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция // Лань, Санкт-Петербург. - 2000.- С. 272.
5. Васильев Б.Я., Грицко Р.Ю., Марченко Л.Г., Васильева Р.И. Вирусоносительство при ротавирусной инфекции // Вопросы вирусологии. - 1996.-№ 6.-С. 265-267.
6. Григорович М.С., Бондаренко А.Л., Зайцева Г.А., Золотарев Ю.В. Клинико- иммунологические аспекты ротавирусной инфекции у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1999. - № 6. - С. 34-38.
7. Гудков В.Г., Виринская А.С., Малявко Д.В., Ключарева А.А., Себут Н.С., Бискина Н.М., Плотникова К.Ю., Новацкая Ю.В., Пашкович В.В., Голотик Д.М., Гриневич О.В., Ключко Н.Л., Будрик Е.А., Зуева В.Л. Ротавирусная инфекция в Беларуси // Здоровоохранение. – 2008. - №11. – С.8-13.
8. Гудков В.Г., Виринская А.С., Плотникова К.Ю., Бискина Н.М., Новацкая Ю.В., Малявко Д.В., Ключарева А.А., Карпук Г.В., Ключко Н.Л. Ротавирусная инфекция в Республике Беларусь: характеристика

- эпидемического процесса, оценка бремени заболевания и структура G-Р популяции возбудителя // *Здравоохранение*. – 2010. - №11. – С.28-33.
9. Мальков Н.В., Саухат В.Р., Краснова Е.В. Ротавирусная инфекция // *Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Магадан*. - 2002. - С. 49
10. Подколзин А.Т., Абрамычева Н.Ю., Фенске Е.Б. и др. Разработка методик детекции возбудителей острых кишечных инфекций на основе мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации "по конечной точке" // *Генодиагностика инфекционных болезней: Материалы Российской научно-практической конференции* - 2005. - С. 216-221.
11. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Кишечные инфекции и инвазии: Ротавирусные инфекции // *Инфекционные болезни и эпидемиология / ГЭОТАР-МЕД, Москва*. - 2002. - С. 168-190.
12. Хаустов В.И., Казачков Ю.А., Королев М.Б., Шекоян Л.А. Исследование ротавирусов методами электронной микроскопии и электрофореза РНК в полиакриламидном геле // *Вопросы вирусологии*. - 19886. - Т. 33. - № 6. - С. 743-745.
13. Adler M., Schulz S., Fischer R., Niemeyer C.M. Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2005. - V. 333 (4).-P. 1289-1294.
14. Ahmed M.U., Kobayashi N., Wakuda M. et al. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001 // *J. Med. Virol.* - 2004.-V. 72(1).-P. 149-155.
15. Angel J., Franko M.A. Rotaviruses / Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V. *Encyclopedia of virology*. – 3 ed. – Elsevier Ltd, 2008. – P.507 – 513.
16. Arias C.F., Dector M.A., Segovia L. et al. RNA silencing of rotavirus gene expression // *Virus Res.* - 2004. - V. 102 (1). - P. 43-51

17. Arias C.F., Isa P., Guerrero C.A. et al. Molecular biology of rotavirus cell entry // *Arch. Med. Res.* - 2002. - V. 33 (4). - P. 356-361.
18. Arias C.F., Romero P., Alvarez V., Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity // *J. Virol.* - 1996. - V. 70 (9). - P. 5832-5839
19. Ball J.M., Mitchell D.M., Gibbons T.F., Parr R.D. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin // *Viral Immunol.* - 2005. - V. 18 (1). - P. 27-40.
20. Ballotti S., de Martino M. Rotavirus infections and development of type 1 diabetes: an evasive conundrum // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* - 2007. - V. 45(2).-P. 147-156.
21. Barro M., Patton J.T. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7 // *J. Virol.* - 2007. - V. 81 (9). - P. 4473-4481.
22. Bernstein D.I. RIX4414 (Rotarix): a live attenuated human rotavirus vaccine // *J. Pediatr. (Rio J.)* - 2007. - V. 83 (3). - P. 193-195.
23. Bishop R.F., Bugg H.C., Masendycz P.J. et al. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs // *J. Infect. Dis.* - 1996. - V. 174 (Suppl 1). - P. S22-S29
24. Blutt S.E., Crawford S.E., Warfield K.L. et al. The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation // *J. Virol.* - 2004. - V. 78 (13). - P. 6974-6981.
25. Borghan M.A., Mori Y., El Mahmoudy A.B. et al. Induction of nitric oxide synthase by rotavirus enterotoxin NSP4: implication for rotavirus pathogenicity // *J. Gen. Virol.* - 2007. - V. 88 (Pt 7). - P. 2064-2072.
26. Bryce J., Boschi-Pinto C., Shibuya K., Black R.E. WHO estimates of the causes of death in children // *Lancet.* - 2005. - V. 365 (9465). - P. 1147-1152.
27. Campagna M., Eichwald C., Vascotto F., Burrone O.R. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle // *J. Gen. Virol.* - 2005. - V. 86 (Pt 5). - P. 1481-1487.

28. Carpio R.V., Gonzalez-Nilo F.D., Jayaram H. et al. Role of the histidine triad-like motif in nucleotide hydrolysis by the rotavirus RNA-packaging protein NSP2 // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279 (11). - P. 10624-10633
29. Castello A.A., Arvay M.L., Glass R.I., Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years // *Pediatr. Infect. Dis. J.* - 2004. - V. 23 (Suppl 10). - S168-S172.
30. Chen D.Y., Estes M.K., Ramig R.F. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope // *J. Virol.* - 1992. - V. 66 (1). - P. 432-439.
31. Colomina J., Gil M.T., Codoner P., Buesa J. Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection // *J. Med. Virol.* - 1998. - V. 56 (1). - P. 58-65.
32. Cook N., Bridger J., Kendall K., Gomara M.I. et al. The zoonotic potential of rotavirus // *J. Infect.* - 2004. - V. 48 (4). - P. 289-302.
33. D'Agostino J. Considerations in assessing the clinical course and severity of rotavirus gastroenteritis // *Clin. Pediatr. (Phila.)* - 2006. - V. 45 (3). - P. 203-212.
34. Dennehy P. H. Rotavirus vaccines: an overview // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2008. - V. 21 (1). - P. 198-208
35. Eichwald C., Jacob G., Muszynski B. et al. Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2004a. - V. 101 (46). - P. 16304-16309.
36. Eichwald C., Vascotto F., Fabbretti E., Burrone O.R. Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains // *J. Virol.* - 2002. - V. 76 (1). - P. 3461-3470
37. Esona M.D., Humphrey C.D., Dennehy P. H., Jiang B. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States // *J. Clin. Virol.* - 2008. - V. 42 (2). - P. 221-224.

38. Estes M.K., Rotaviruses and their replication // Fields virology, ed. Knipe D.N., Howley P.M., Griffin D.E. // Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia - 2001.- P. 1747-1786.
39. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function // Microbiol. Rev. - 1989. - V. 53 (4). - P. 410-449.
40. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses / Knipe D.M., Howley P.M. Fields Virology – 5 ed. – Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – Ch. 52. – P. 1918-1975.
41. Estes M.K., Kang G., Zeng C.Q. et al. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis // Novartis. Found. Symp. - 2001. - V. 238 - P. 82-96.
42. Feng N., Lawton J. A., Gilbert J. et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb // J. Clin. Invest. - 2002. - V. 109 (9).-P. 1203-1213.
43. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B.K., Bhan M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol.30. – №6. – P.1365–1373.
44. Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B. et al. Serotype diversity between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs // J. Infect. Dis. - 2005. - V. 192 (Suppl 1). - 146-159.
45. Gladstone B.P., Iturriza-Gomara M., Ramani S. et al. Polymerase chain reaction in the detection of an 'outbreak' of asymptomatic viral infections in a community birth cohort in south India // Epidemiol. Infect. - 2008. - V. 136 (3). - P. 399-405.
46. Graff J.W., Ewen J., Ettayebi K., Hardy M.E. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability // J. Gen. Virol. - 2007. - V. 88 (Pt2). - P. 613-620.

47. Gunson R.N., Miller J., Leonard A., Carman W.F. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community // *Commun. Dis. Public Health.* - 2003. - V. 6 (1). - P. 63-65.
48. Jayaram H., Estes M.K., Prasad B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication // *Virus Res.* - 2004. - V. 101 (1).-P. 67-81.
49. Jiang B., Gentsch J.R., Glass R.I. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview // *Clin. Infect. Dis.* - 2002. - V. 34 (10). - P.1351-1361.
50. Jiang X., Jayaram H., Kumar M. et al. Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication // *J. Virol.* - 2006. - V. 80 (21). - P. 10829-10835.
51. Kelkar S.D., Bhide V. S., Ranshing S.S., Bedekar S.S. Rapid ELISA for the diagnosis of rotavirus // *Indian J. Med. Res.* - 2004. - V. 119 (2). - P. 60-65.
52. Kerin T.K., Kane E.M., Glass R.I., Gentsch .T.R. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002 // *Virus Genes.* - 2007. - V. 35 (3). - P. 489-495.
53. Kilgore P. E., Holman R.C., Clarke M.J., Glass R.I. Trends of diarrhoeal disease-associated mortality in US children, 1968 through 1991 // *JAMA.* - 1995. - V. 274 (14).-P. 1143-1148.
54. Kumar M., Jayaram PI., Carpio R.V. et al. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals an NDP kinase like activity // *J. Virol.* - 2007. - V. 81 (22).-P. 12272-12284.
55. Lopez T., Camacho M., Zayas M. et al. Silencing the morphogenesis of rotavirus // *J. Virol.* - 2005. - V. 79 (1). - P. 184-192
56. Lorrot M., Vasseur M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? // *Virol. J.* - 2007. - V. 4. - P. 31.
57. Lovmar L., Fock C., Espinoza F. et al. Microarrays for genotyping human group a rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension // *J. Clin. Microbiol.* - 2003. - V. 41 (11).-P. 5153-5158.

58. Makela M., Marttila J., Simell O., Ilonen J. Rotavirus-specific T-cell responses in young prospectively followed-up children // *Clin. Exp. Immunol.* - 2004. - V. 137 (1). - P. 173-178.
59. Mascarenhas J.D., Leite J.P., Lima J.C. et al. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin // *J. Med. Microbiol.* - 2007b. - V. 56 (Pt 4). - P. 524-532.
60. Mathieu M., Petitpas I., Navaza J. et al. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion // *EMBO J.*
61. Matthijnsens J., Ciarlet M., Heiman E., Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals Common Origin between Human Wa-like and Porcine rotavirus strains and Human DS-1-like and Bovine Rotavirus strains // *J. Virol.* - 2008. - V. 82 (7). - P. 3204-3219.
62. McDonald SM, Patton JT. Molecular Characterization of A Subgroup Specificity Associated With The Rotavirus Inner Capsid Protein VP2 // *J. Virol.* - 2008. - V. 82 (6). - P. 2752-2764.
63. Mithun Karen, Kapikian Albert Z. Rotavirus vaccines: an overview // *Clinical Microbiology Reviews.* – 1996. – Vol.9. - №3. – P.423-434.
64. Mohan K.V., Muller J., Som I., Atreya C.D. The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2 // *J. Virol.* - 2003. - V. 77 (22). - P. 12184-12192
65. Morrison C., Gilson T., Nuovo G.J. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: an immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis // *Hum. Pathol.* - 2001. - V. 32 (2). - P. 216-221.
66. Newall A.T., Macintyre R., Wang H. et al. Burden of severe rotavirus disease in Australia // *J. Paediatr. Child Health.* - 2006. - V. 42 (9). - P. 521-527.
67. Nishio O., Matsui K., Oka T. et al. Rotavirus infection among infants with diarrhea in Pakistan // *Pediatr. Int.* - 2000. - V. 42 (4). - P. 425-427.

68. O'Ryan M.L., Matson D.O., Estes M.K., Pickering L.K. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections // *J. Infect. Dis.* - 1994. - V. 169 (3). - P. 504-511.
69. Patton J.T. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins // *J. Gen. Virol.* - 1995. - V. 76 (Pt 11). - P. 2633-2644.
70. Patton J.T., Vasquez-Del Carpio R., Tortorici M.A., Taraporewala Z.F. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly // *Adv. Virus Res.* - 2007. - V. 69-P. 167-201.
71. Pesavento J.B., Lawton J.A., Estes M.E., Venkataram P.B.V. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2001. - V. 98 (4). - P. 1381-1386.
72. Phan T.G., Khamrin P., Quang T.D. et al. Detection and Genetic Characterization of Group A Rotavirus Strains Circulating among Children with Acute Gastroenteritis in Japan // *J. Virol.* - 2007a. - V. 81 (9). - P. 4645-4653.
73. Rainsford E.W., McCrae M.A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11 // *Virus Res.* - 2007. - V. 130 (1-2). - P. 193-201.
74. Ruiz-Palacios G.M., Perez-Schael I., Velazquez F.R. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis // *N. Engl. J. Med.* -
75. Rzezutka A., Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2004. - V. 28 (4). - P. 441-453.
76. Saif L.J., Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 1994. - V. 185 - P. 339-371
77. Santos N., Flosino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine // *Rev. Med. Virol.* - 2005. - V. 15 (I). - P. 29-56

- 78.Sen A., Sen N., Mackow E.R. The Formation of Viroplasm-like Structures by the Rotavirus NSP5 Protein is Calcium-Regulated and Directed by a C-terminal Helical Domain//J. Virol. -2007.- V. 81 (21).-P. 11758-11767
- 79.Silvestri L.S., Tortorici M.A., Vasquez-Del Carpio R., Patton J.T. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell // J. Virol. - 2005. - V. 79 (24). - P. 15165-15174.
- 80.Soriano-Gabarro M., Mrukowicz J., Vesikari T., Verstraeten T. Burden of rotavirus disease in European Union countries // *Pediatr. Infect. Dis. J.* - 2006. - V. 25 (Suppl 1)-P. S7-S11.
- 81.Steele A.D., Peenze I., de Beer M.C. et al. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa // *Vaccine.* - 2003. - V. 21 (5-6). - P. 354-360.
- 82.Stockman L. J., Staat M. A., Holloway M. et al. Optimum diagnostic assay and clinical specimen for routine rotavirus surveillance // *J. Clin. Microbiol.* - 2008. - V. 46 (5).-P. 1842-1843.
- 83.Suzuki H., Sakai T., Tanabe N., Okabe N. Peak rotavirus activity shifted from winter to early spring in Japan // *Pediatr. Infect. Dis. J.* - 2005. - V. 24 - P. 257-260
- 84.Taraporewala Z.F., Patton J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae // *Virus Res.* - 2004. - V. 101 (1). - P. 57-66.
- 85.Tavares T.M., Brito W.M., Fiaccadori F.S. et al. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* - 2008. - V. 103 (3). - P. 288-294.
- 86.Torres-Vega M.A., Gonzalez R.A., Duarte M. et al. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6 // *J. Gen. Virol.* - 2000. - V. 81 (Pt 3). - P. 821-830.

87. Van Damme P., Giaquinto C., Maxwell M. et al. Distribution of Rotavirus Genotypes in Europe, 2004-2005: The REVEAL Study // *J. Infect. Dis.* - 2007. - V. 195 (Suppl 1). -S17-S25.
88. Vende P., Tortorici M.A., Taraporewala Z.F., Patton J.T. Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis // *Virology.* - 2003. - V. 313 (1). - P. 261-273.
89. Vesikari T., Clark H. F., Offit P. A. et al. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants // *Vaccine.* - 2006. - V. 24 (22)-P. 4821-4829.
90. Vitour D., Lindenbaum P., Vende P. et al. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3 // *J. Virol.* - 2004. - V. 78 (8). - P. 3851-3862.
91. Wang Y., Dennehy P.H., Keyserling H.L. et al. Rotavirus infection alters peripheral T-cell homeostasis in children with acute diarrhea // *J. Virol.* - 2007. - V. 81 (8).-P. 3904-3912.
92. Wilhelmi I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis // *Clin. Microbiol. Infect.* - 2003. - V. 9 (4). - P. 247-262
93. World Health Organization. Generic protocol for (i) hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a community-based surveillance on utilization of health care services for gastroenteritis in children. – 2002. Geneva, WHO – P.67/
94. World Health Organization. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. – 2013. – Vol.7. – P.11
95. Xu J., Dennehy P., Keyserling H. et al. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection // *Clin. Diagn. Lab Immunol.* - 2005. - V. 12 (2). - P. 273-279.

