

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора

На правах рукописи

Морозова Ольга Владимировна

**Генотиповое разнообразие и филогенетика циркулирующих
на территории России ротавирусов, сравнение с вакцинными штаммами**

03.02.02 – Вирусология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Новикова Н.А.

Москва – 2021

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1 Современная классификация ротавирусов.....	12
2 Молекулярно-биологическая характеристика ротавирусов.....	15
2.1 Структура вириона и генома.....	15
2.2 Инфекционный цикл.....	18
3 Формирование иммунного ответа на ротавирусную инфекцию.....	22
4 Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции.....	27
4.1 История создания ротавирусных вакцин.....	27
4.2 Современные вакцины.....	28
4.3 Эффективность вакцин в развитых и развивающихся странах.....	32
4.4 Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции в России.....	34
4.5 Последствия массовой вакцинации.....	36
5 Филогенетические подходы к изучению вирусов.....	38
II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
1 Исследуемый материал.....	43
2 Методы.....	45
2.1 Подготовка биоматериала для исследования.....	45
2.2 Выявление РНК ротавируса из образцов биоматериала.....	45
2.3 Электрофорез РНК ротавирусов в полиакриламидном геле (РНК-ПААГ)	46
2.4 Генотипирование ротавирусов методом мультиплексной ПЦР.....	47
2.5 Определение нуклеотидной последовательности кДНК.....	48
2.6 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей.....	50
III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	51
1 Характеристика типовой структуры нижегородской популяции ротавируса...	51
1.1 Спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в период 2016-2020 гг.	51

1.2 Характеристика штаммов с генотипом G2P[4], изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг.....	55
1.3 Выявление и характеристика Wa- и DS-1-подобных реассортантов ротавируса.....	61
1.4 Филогенетическая характеристика штаммов ротавируса с генотипами G4P[8] и G2P[4] на основе полного генома.....	66
2 Филогенетические взаимоотношения вакцинных штаммов и ротавирусов глобальных генотипов, циркулирующих на территории России.....	75
2.1 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена белка наружного капсида VP7.....	76
2.2 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена белка наружного капсида VP4.....	80
2.3 Филогенетическая характеристика ротавируса А на основе гена белка внутреннего капсида VP6.....	83
2.4 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена неструктурного белка NSP4.....	90
3 Анализ антигенных эпитопов вакцинных и российских штаммов РВА дикого типа	93
3.1 Сравнительный анализ нейтрализующих антигенных эпитопов	93
3.1.1 Нейтрализующие антигенные эпитопы белка VP7	94
3.1.2 Нейтрализующие антигенные эпитопы белка VP4	100
3.1.3 В-клеточные антигенные эпитопы белка VP6	105
3.2 Сравнительный анализ линейных эпитопов вакцинных и российских штаммов РВА дикого типа.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	168

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ротавирусы вида А (РВА, *Rotavirus A*, род *Rotavirus*, семейство *Reoviridae*, подсемейство *Sedoreovirinae*, порядок *Reovirales*), до настоящего времени являются одной из основных причин острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни [62, 248, 291, 301]. В мире, в довакцинальный период 1986-2006 гг., ротавирусы ежегодно вызывали более 111 миллионов случаев гастроэнтерита, которые не требовали консультации терапевта, 25 миллионов случаев, требовавших визита в клинику, 2 миллиона госпитализаций и 453 тысячи смертей детей младшего возраста [248, 301].

В настоящее время для профилактики ротавирусной инфекции в мире нашли широкое применение две вакцины: пятивалентная реассортантная (RotaTeq®, RV5) и моновалентная человеческая аттенуированная вакцина (Rotarix®, RV1) [85, 323]. В ряде стран применяют региональные вакцины на основе реассортантных или моновалентных аттенуированных штаммов животных и человека [60, 96, 131, 240, 289]. Массовая вакцинация, введенная в национальные календари более 100 стран, позволила существенно снизить количество смертей и тяжелых, требующих госпитализации, случаев ротавирусного гастроэнтерита (РВГЭ) [70, 254, 291].

В Российской Федерации у детей в возрасте до 5 лет, находящихся на стационарном лечении по поводу острой кишечной инфекции, РВА являются причиной острого гастроэнтерита в 43 % случаев. В числе амбулаторных обращений РВГЭ составляет 31 %, достигая 75 % в некоторых регионах [3]. По данным государственного доклада о санитарном благополучии за 2019 год, ущерб от ротавирусной инфекции составил 8 431 262,1 тыс. рублей, заняв шестое ранговое место. На территории России для профилактики ротавирусной инфекции зарегистрирована живая пентавалентная вакцина, применение которой регламентировано по эпидемическим показаниям¹. Отсутствие массовой

¹ Приказ Минздрава России от 21.03.2014 №125н

вакцинации детского населения и медленное формирование коллективного иммунитета обуславливают ежегодный подъем заболеваемости РВГЭ. При этом, следует учитывать, что существующие вакцины даже при широком применении не останавливают циркуляцию и эволюцию вирусов и не исключают риск формирования штаммов с повышенной вирулентностью, репликативной активностью или контагиозностью. Все перечисленное выше может послужить причиной внезапных эволюционных изменений в популяции возбудителя, что определяет важность слежения за генотиповым разнообразием ротавируса.

Вирион ротавируса представляет собой трехслойную частицу, образованную по принципам икосаэдральной симметрии, содержащую 11 сегментов двухцепочечной РНК, кодирующих шесть структурных белков (VP1-VP4, VP6, VP7) и пять или шесть неструктурных белков (NSP1-NSP5/6). Основными антигенами, формирующими протективный иммунитет после перенесенной ротавирусной инфекции, являются белки наружного капсида VP7 и VP4 [119]. Получены данные о роли VP6-антител в защите от тяжелого течения инфекции [71, 196].

На свойствах двух протеинов наружного капсида вириона – VP7 (G – гликопротеин) и VP4 (P – протеазочувствительный) – основана бинарная номенклатура ротавирусов. В настоящее время идентифицированы 36 G- и 51 [P]-генотипов ротавируса, изолированных от животных и человека [223]. Большинство ротавирусов, инфицирующих человека, относятся к шести G[P] генотипам: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [52, 225, 281]. На территории России, в том числе в Нижнем Новгороде, подавляющее большинство типированных РВА относятся к пяти генотипам: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] [1, 6, 14, 172]. В последнее время в мире стали выявлять новые, необычные и не характерные для территории нашей страны штаммы ротавируса, отличающиеся по антигенным свойствам от вакцинных [40, 237, 338]. Поскольку вакцинные штаммы были выделены более 30 лет назад, динамичная эволюция ротавирусной популяции делает актуальным, научно и практически значимым проведение молекулярного мониторинга циркулирующих ротавирусов, изучения их филодинамики и

сравнительного анализа с вакцинными штаммами в области антигенных детерминант.

Степень разработанности проблемы

В настоящее время в мире проводятся исследования, направленные на изучение влияния вакцинопрофилактики на заболеваемость РВГЭ [68, 69, 213]. Отечественными исследователями показана высокая эффективность вакцинопрофилактики ротавирусного гастроэнтерита с целью снижения числа тяжелых случаев течения инфекции и случаев, требующих госпитализации [5, 12, 15, 20, 22, 24, 25, 27].

Одним из ведущих направлений научных исследований является изучение генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих на разных территориях в условиях применения вакцин и при отсутствии вакцинопрофилактики [100, 214, 287]. Для многих территорий Российской Федерации охарактеризован типовой состав ротавирусных популяций, выявлены доминирующие генотипы ротавируса [1, 6, 14, 172]. В Нижегородском НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной наблюдения за циркуляцией ротавирусов разных типов и их сменой проводятся на протяжении 36 лет [244, 245].

У ротавирусов дикого типа, циркулирующих на территории ряда стран (Бельгия, Арабские Эмираты, Тунис, Финляндия, Индия, Иран, Аргентина и др.), выявлены филогенетические отличия от вакцинных штаммов, обнаружены мутации в области сайтов антигенной нейтрализации [28, 93, 152, 192, 235, 236, 335]. Однако, для штаммов ротавируса, изолированных на территории России, такая сравнительная характеристика не проводилась.

Целью работы является характеристика генетического разнообразия и расчет филодинамических параметров циркулирующих ротавирусов, их сравнение с вакцинными штаммами.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить типовой состав и дать молекулярно-генетическую характеристику популяции ротавируса вида А в Нижнем Новгороде в период 2016-2020 гг.

2. Дать филодинамическую характеристику нижегородских изолятов ротавируса с генотипами G4P[8] и G2P[4] на основе полного генома.
3. Установить нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 нижегородских ротавирусов.
4. Провести филогенетический анализ российских и вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix® на основе генов VP7, VP4, VP6 и NSP4.
5. Дать сравнительную характеристику выведенных аминокислотных последовательностей в регионах антигенных детерминант белков VP7, VP4, VP6 и NSP4 штаммов ротавирусов дикого типа и компонентов вакцин.

Научная новизна работы

Определен спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в новый, ранее не охарактеризованный период 2016-20 гг. Спектр включал 14 G[P]комбинаций: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8], G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]. Впервые показано доминирование штаммов с генотипом G2P[4] в сезон 2018-19 гг. Впервые показана циркуляция на территории России штаммов ротавируса с генотипом E3 гена NSP4, на территории Нижнего Новгорода – ротавирусов генотипа G12 и G8 гена VP7.

При ретроспективном исследовании РВА, выявленных в 2013-14 гг., впервые показана циркуляция ротавируса с генотипом G1P[8]-I2-E2, имеющего «короткий» электрофоретип РНК (2,6 %), который является двойным межгрупповым реассортантом между Wa- и DS-1-подобными ротавирусами. Установлено родство данного варианта со штаммами, изолированными на территориях Японии и Таиланда. В 2019-20 гг. доля межгрупповых реассортантов в нижегородской популяции ротавируса составила 12,7 %.

Впервые определена полная нуклеотидная последовательность генома ротавирусов с генотипом G4P[8] и G2P[4], изолированных в России. На основе всех 11 сегментов генома проведен филогеографический анализ штаммов, позволивший установить их полифилетическое происхождение.

Установлены нуклеотидные последовательности генов VP7 (124), VP4 (48), VP6 (30) и NSP4 (15) новых российских (Нижний Новгород) штаммов РВА.

Последовательности депонированы в GenBank, что расширяет международную базу данных нуклеотидных последовательностей генома ротавирусов вида А.

Выявлены аминокислотные различия в области нейтрализующих эпитопов белков VP7 и VP4 у вакцинных штаммов и российских ротавирусов с генотипами G1, G2, G3, G4, G9, P[8] и P[4]. У РВА в составе вакцины RotaTeq® установлено меньшее количество различий (в сравнении с вакциной Rotarix®) с российскими штаммами дикого типа ввиду ее поливалентности. Наибольшее количество различий показано в нейтрализующих эпитопах VP7 российских РВА генотипа G9. Установлена высокая консервативность эпитопов белка VP6 вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix® и штаммов ротавируса дикого типа.

Впервые проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных Т-клеточных эпитопов белков VP7, VP6 и NSP4, в ходе которого установлена вариабельность аминокислотного состава в области антигенных детерминант VP7. Показана консервативность Т-клеточных эпитопов белков VP6 и NSP4.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данные о генотиповой структуре РВА в новый, не охарактеризованный ранее период времени, дополняют результат многолетних наблюдений за динамикой циркуляции ротавирусов разных типов, что имеет значение для понимания внутренних причин развития эпидемического процесса при ротавирусной инфекции и оценке возможного воздействия вакцин на типовое разнообразие.

Установленные и депонированные в международной базе данных нуклеотидные последовательности генома ротавирусов могут быть использованы для установления места российских штаммов в мировой популяции.

Рассчитанные филодинамические характеристики вносят вклад в понимание эволюционных закономерностей, происходящих внутри популяции ротавируса, дают возможность оценки времени формирования эпидемически значимых вариантов, что позволяет совершенствовать эпидемиологический надзор за распространением этого патогена.

Результаты филогенетического анализа современных российских изолятов ротавируса вида А и вакцинных штаммов в составе RotaTeq® и Rotarix®, а также анализа аминокислотных последовательностей в области антигенных детерминант могут иметь значение при разработке отечественных вакцин.

Результаты обнаружения ротавирусов у детей, госпитализированных с острой кишечной инфекцией, оперативно сообщались в инфекционный стационар и ежемесячно направлялись в Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области, где использовались в официальной статистике инфекционной заболеваемости в Нижегородской области (Акты внедрения от 30 января 2019 и 20 января 2020).

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования в ходе выполнения работы были использованы молекулярно-генетические методы, такие как выделение РНК из клинического материала, постановка реакции обратной транскрипции, постановка полимеразной цепной реакции, секвенирование полученных фрагментов кДНК по Ф. Сэнгеру. Секвенирование полного генома было осуществлено с использованием технологии NGS, Illumina MiSeq. Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей, расчет гомологии, проводили с использованием программ MEGA5 и UGENE. Филогенетический и филогеографический анализы осуществляли с применением Байесовского подхода.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Типовая структура нижегородской популяции в 2016-20 гг. была представлена как минимум 14 G[P]-типами РВА и включала типичные штаммы Wa-подобной (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8]) и DS-1-подобной (G2P[4]) геногрупп и межгеногрупповые реассортанты (G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]).

2. Нижегородские штаммы с генотипами G4P[8] и G2P[4] несут типичные для представителей первой и второй геногрупп сочетания всех 11 генов и имеют полифилетическое происхождение.

3. Российские ротавирусы и штаммы вакцин RotaTeq® и Rotarix® по генам VP7, VP4, VP6 и NSP4, кодирующим основные протективные антигены, относятся к разным филогенетическим линиям.

4. Российские ротавирусы глобальных типов имеют отличия от вакцинных штаммов в эпитопах антигенной нейтрализации белков VP7 и VP4 и консервативны в антигенных сайтах белка VP6. В области линейных T-клеточных эпитопов показаны аминокислотные замены для белка VP7 и консервативность белков VP6 и NSP4.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- на 31-й ежегодной встрече Европейского общества по педиатрическим инфекциям, 28 мая – 1 июня 2013 г., Италия, Милан;

- на VI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 24-26 марта 2014 г., Москва;

- на VII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 30 марта – 1 апреля 2015 г., Москва;

- на VIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 28-30 марта 2016 г., Москва;

- на IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика», 18-20 апреля 2017 г., Москва;

- на X Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, 26-28 февраля 2018 г., Москва;

- на 13-м ежегодном симпозиуме по исследованию ротавирусной инфекции, 29-31 августа 2018 г., Минск, Беларусь.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ в изданиях, индексируемых в РИНЦ, семь из них – в изданиях рекомендованных ВАК по специальности 03.02.02 вирусология, а также индексируемых в Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Материалы научно-квалификационной работы изложены на 179 страницах печатного текста. Работа состоит из введения,

обзора литературы, описания материалов и методов исследования, основной части работы, в которой описаны полученные результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы, включающего 340 источников отечественных и зарубежных авторов, и приложения. Диссертация иллюстрирована 20 рисунком и 13 таблицами.

Вклад автора в диссертационную работу. Основные результаты, представленные в работе, получены автором лично. На разных этапах исследования в работе приняли участие Н.В. Епифанова, Т.А. Сашина, А.Ю. Кашников, С.Г. Фомина, В.В. Зверев, которым автор выражает искреннюю благодарность. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору Н.А. Новиковой.

I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 Современная классификация ротавирусов

Ротавирусы – РНК-содержащие вирусы (III группа согласно классификации вирусов по Балтимору), имеют следующее таксономическое положение: реалм *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Duplornaviricota*, класс *Resentoviricetes*, порядок *Reovirales*, семейство *Reoviridae*, подсемейство *Sedoreovirinae*, род *Rotavirus*.

Серологически на основе антигенной специфичности внешних и внутренних белков капсида ротавирусы классифицированы на группы. В соответствии с антигенными свойствами белка VP6, ротавирусы разделены на десять серогрупп (А-J), которые в настоящее время получили статус видов² [53, 227, 232]. Патогенными для человека являются ротавирусы видов А, В, С и Н из которых большинство (до 98 % исследованных образцов) принадлежит виду *Rotavirus A* (РВА) [120, 239]. Представители разных видов ротавируса отличаются друг от друга генетически и не способны к реассортации генов, тогда как в рамках одного вида обмен сегментами генома возможен [120].

Интенсивное изучение ротавирусов человека со времени их открытия в 1973 году [61, 126] позволило выявить внутри группы А существование различных серологических подгрупп, серотипов, представители которых имеют различные профили миграции сегментов геномной РНК в ПААГ (электрофоретипы РНК) [84]. Электрофорез является быстрым и удобным способом идентификации ротавируса, групповой и субгрупповой дифференциации штаммов [200], но не позволяет выявить тонкие генетические различия штаммов.

² Согласно международному коду вирусной классификации и номенклатуры, от февраля 2013 года, вид - низший таксономический уровень в иерархии, представляющий собой группу вирусов, свойства которых можно отличить от других видов по нескольким критериям. Эти критерии устанавливаются соответствующей исследовательской комиссией, они могут включать: природный или экспериментальный круг хозяев, клеточный и тканевый тропизм, патогенность, антигенность, степень родства геномов или генов.

Существует несколько вариантов нетаксономической классификации РВА. VP6 был первым белком, использованным для классификации ротавирусов, на основе его серологической перекрестной реактивности и генетической изменчивости. Внутри ротавирусов вида А с помощью моноклональных антител к VP6 выделяют четыре субгруппы (SGI, SGII, SG I + II и SG не-I, не-II) [144, 170].

Одной из наиболее устоявшихся является бинарная классификация, основанная на свойствах белков наружного капсида VP7 и VP4. На основе антигенной и генетической дифференцировки этих протеинов и генов РВА классифицированы на G-(гликопротеин VP7) и P-(протеазчувствительный VP4) типы. В настоящее время получены данные о 36 G- и 51 [P]- типах РВА, изолированных от человека и животных [278].

Сегментированный геном РВ, способный к реассортации, позволяет G- и P-типам группироваться независимо друг от друга, что дает потенциальную возможность существования огромного количества различных комбинаций. Однако в действительности их число гораздо меньше. В последнее десятилетие более 90 % ротавирусов, циркулирующих в мире, имеют шесть комбинаций G и [P] генотипов, которые называют «глобальными»: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [225, 229, 233, 281]. В развитых странах в некоторые годы РВА этих генотипов явились причиной практически 100 % ротавирусных инфекций [171, 253].

Недостатком бинарной системы классификации является то, что она не позволяет получить информацию о типовом разнообразии других сегментов ротавирусного генома. Гены, кодирующие разные белки, также могут распределяться независимо, благодаря способности геномных сегментов к реассортации при одновременном инфицировании клетки вирусами разных типов [119].

Ограничения бинарной номенклатуры были преодолены путем разработки в 2008 году классификационной системы, основанной на анализе полного генома, позволяющей отнести каждый генный сегмент вируса к определенному генотипу. Для генов, кодирующих белки VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3,

NSP4 и NSP5/NSP6, используют акроним Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, соответственно. Для каждого сегмента установлено от 20 до 51 генотипов (Таблица 1). Данная система позволяет выявлять стабильные сочетания генов, редкие генотипы, которые следовали отдельным эволюционным путем, явления межвидовой трансмиссии и реассортации генов ротавирусов [223].

Таблица 1. Пороговый процент идентичности нуклеотидных последовательностей в рамках одного генотипа и количество обнаруженных генотипов ротавирусов вида А [223, 278]

Генный продукт	Порог процента идентичности в рамках одного генотипа	Количество генотипов и аббревиатура гена
VP7	80 %	36 G
VP4	80 %	51 P
VP6	85 %	26 I
VP1	83 %	22 R
VP2	84 %	20 C
VP3	81 %	20 M
NSP1	79 %	31 A
NSP2	85 %	22 N
NSP3	85 %	22 T
NSP4	85 %	27 E
NSP5	91 %	22 H

В 2008 году была создана рабочая группа по классификации ротавирусов (RCWG), включающая молекулярных вирусологов, специалистов по инфекционным болезням и эпидемиологов, усилиями которых информация о классифицируемых штаммах и выделении новых генотипов регулярно обновляется и публикуется (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>).

Несмотря на многообразие генотипов РВА, эпидемически важные штаммы принадлежат к двум конstellляциям генов, таким как Wa-подобные и DS-подобные штаммы, имеющие общие корни с ротавирусами свиней и быков, соответственно (Таблица 2).

Таблица 2. Полногеномная характеристика Wa-, DS-1- и AU-1-подобных штаммов

Штамм	Ген										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Wa-подобные	Gx	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
Ds-1-подобные	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
AU-1-подобные	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3

К третьей, малочисленной группе относятся AU-1-подобные ротавирусы, которые имеют близкое родство с ротавирусами кошек и собак [18, 241]. В соответствии с порядком открытия и изучения генотипов, группы Wa-, DS-1- и AU-1-подобных штаммов стали относить к первой, второй и третьей геногруппам, конstellляции генов типовых штаммов.

2 Молекулярно-биологическая характеристика ротавирусов

2.1 Структура вириона и генома

Вирион ротавируса представляет собой сферическую частицу диаметром около 100 нм, лишенную липопротеиновой оболочки, организованную по принципам икосаэдральной симметрии с триангуляционным числом, равным 13. Частица сформирована тремя концентрическими слоями белка, которые окружают геном вируса. Белковые слои ротавириона пронизаны каналами (Рисунок 1).

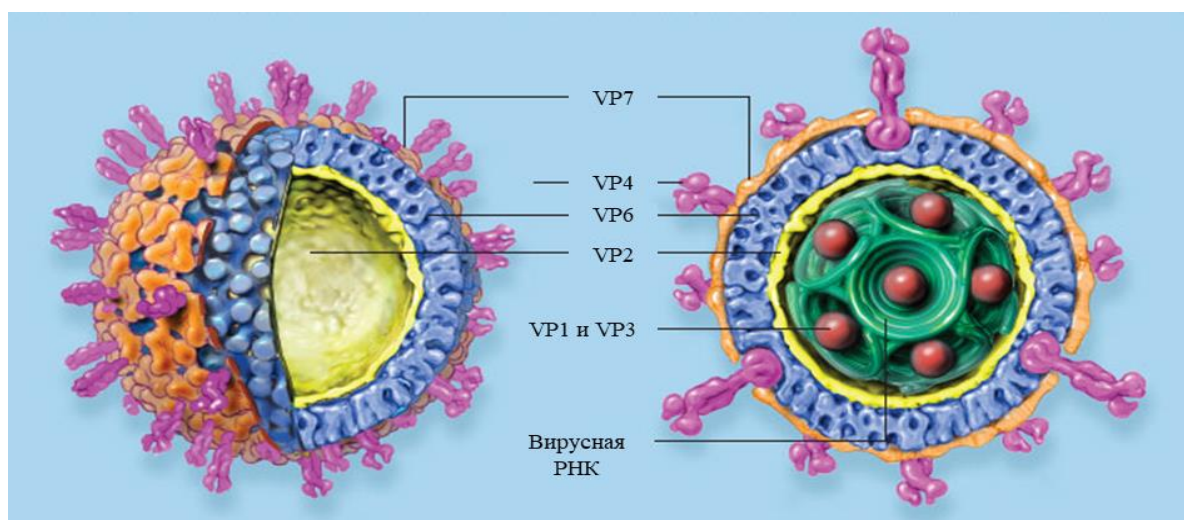


Рисунок 1. Структурная организация ротавириона [173].

Слой наружного капсида формируют два протеина: 120 молекул VP4, образующих выступы на поверхности вириона, и 780 молекул гликопротеина VP7, формирующих сферу. Белки VP7 и VP4 несут ряд функций, таких как связывание с рецептором клетки, проникновение/разделение, гемагглютинации, определяют G и [P] генотипы ротавируса, соответственно, являются антигенами, формирующими протективный иммунитет. Внутренний капсид сформирован белком VP6, отвечающим за видовую принадлежность штаммов РВ и являющимся одним из основных антигенов. Сердцевина («кор») ротавирусной частицы имеет гексагональную форму, образована белками VP1, VP2, VP3 [120].

Сердцевина вириона содержит геномную нуклеиновую кислоту, представленную 11-ю сегментами двунитевой РНК. Каждый сегмент кодирует один вирусный белок, за исключением 11 сегмента, который у некоторых ротавирусов кодирует два белка – NSP5 и NSP6 [228]. Исследования показали, что все неструктурные протеины ротавируса стабильны после их образования, кроме NSP6, который разрушается через два часа после синтеза [270].

Таким образом, вирион несет информацию о 6 структурных протеинах (VP), принимающих участие в построении вирусной частицы, и 5/6 неструктурных белках (NSP), играющих роль на различных стадиях вирусного репликативного цикла (Таблица 3) [120].

Таблица 3. Характеристика сегментов геномной РНК и кодируемых ими белков, на примере ротавируса обезьян SA-11 [223]

№ сегмента	Длина (п.н)	Белок (аббревиатура)	Длина (а.о.)	Мол. масса (kDa)	Локализация белка	Функция
1	3302	VP1 (R)	1088	125.1	Сердцевина	РНК-зависимая РНК полимераз, в комплексе с VP3
2	2690	VP2 (C)	881	102.7	Сердцевина	РНК-связывающая активность, необходима для активации VP1
3	2591	VP3 (M)	835	98.1	Сердцевина	Гуанилилтрансфераза, метилтрансфераза, связывание онРНК, комплекс с VP1
4	2362	VP4 (P)	776	86.8	Наружный капсид	Гемагглютинин, определяет вирулентность, типоспецифический антиген
5	1611	NSP1 (A)	495	58.5	Неструктурный	Антагонист интерферона, предполагаемая вирусная лигаза
6	1356	VP6 (I)	397	44.9	Внутренний капсид	Субгрупповой антиген, необходим для транскрипции, внутриклеточная нейтрализация
7	1059	NSP3 (T)	317	36.4	Неструктурный	Ингибирование трансляции хозяина
8	1104	NSP2 (N)	312	36.6	Неструктурный	Образует вироплазмы, связывание РНК, NDP киназа
9	1062	VP7 (G)	326	37.2	Наружный капсид	Гликопротеин, типоспецифический антиген
10	751	NSP4 (E)	175	20.3	Неструктурный	Гликопротеин, рецептор для однокапсидных частиц, виропорин, энтеротоксин
11	667	NSP5 (H)	198	21.8	Неструктурный	Фосфопротеин, протеинкиназа, связывание РНК

Геномные сегменты собираются и упаковываются в коровый слой как 5' кэпированные и 3' не-полиаденилированные РНК, которые затем достраиваются до днРНК [230]. Все сегменты генома ротавирусов, независимо от генотипа, имеют сходную структуру. На 5'-конце находится гуанидин, за которым следует короткая некодирующая последовательность. Затем следует открытая рамка считывания, кодирующая белковый продукт и оканчивающаяся стоп-кодоном. Далее располагается еще один набор консервативных некодирующих последовательностей, которые важны для экспрессии генов и репликации генома. Считается, что на 5' и на 3' концах каждого сегмента в областях нетранслируемых регионов до начала открытой рамки считывания находятся сигналы упаковки генома [204, 230].

2.2 Инфекционный цикл

При ротавирусной инфекции реализуется фекально-оральный механизм передачи. Ротавирусы выделяются из организма больного в больших количествах, стабильны в окружающей среде и чрезвычайно контагиозны [117]. Инкубационный период заболевания составляет, как правило, менее 48 часов [180].

Ротавирусы реплицируются в первую очередь, но не исключительно, в неделящихся, зрелых энтероцитах тонкого кишечника (Рисунок 2). По всей видимости, дифференцированные энтероциты экспрессируют факторы, необходимые для эффективной репликации вируса. Репликативный цикл ротавирусов включает несколько стадий: адсорбцию, проникновение в клетку-хозяина, транскрипцию, трансляцию вирусных белков, репликацию генома, сборку вирионов и выход зрелых частиц.

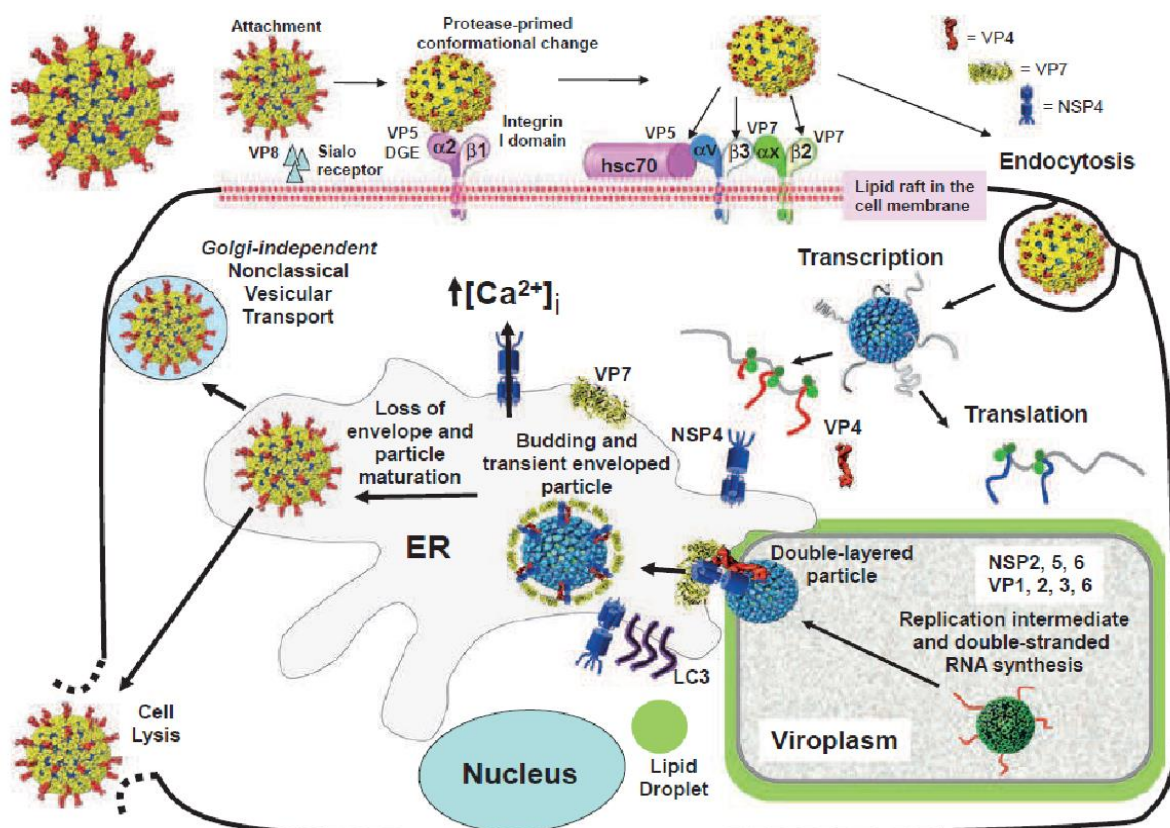


Рисунок 2. Цикл репликации ротавируса [120].

Прикрепление. Специфическая адсорбция ротавириона на поверхности клетки осуществляется с помощью VP4 или продукта его протеолитического расщепления VP8*. Связывание с рецепторами не требует расщепления белка VP4, но необходимо для эффективного входа вируса в клетку [305]. При адсорбции вирус связывается с интегринами α₂β₁ и α_vβ₃ и белком теплового шока hsp70. Глобулярный домен VP8* утрачивается на стадии проникновения и не обнаруживается в цитоплазме [120, 125].

Проникновение. В качестве основного механизма интернализации в восприимчивую клетку, РВА используют рецепторный клатрин-опосредованный эндоцитоз [120, 150, 308, 309]. В рецептосоме за счет снижения концентрации ионов Ca²⁺ наружный капсид ротавириона разрушается, VP7 и VP4 дезинтегрирует мембрану рецептосомы. В цитоплазму клетки-хозяина проникает двухслойная субвирусная частица ротавириона. От связывания с рецептором, до проникновения в цитоплазму проходит 40-60 минут.

После проникновения ротавирус вызывает изменения в организации цитоскелета и биохимии клетки-хозяина, резко снижая уровень клеточных белков. Установлено, что NSP1 взаимодействует с IRF3 (регуляторный фактор интерферона 3), что приводит к его деградации и блокирует врожденный ответ хозяина, направленный на производство интерферона 1 типа [54, 143].

Транскрипция и трансляция. Частичное раздевание вириона обеспечивает доступ нуклеозидтрифосфатов через каналы внутрь субвирусной частицы, что активирует эндогенный полимеразный комплекс. Сегменты геномной днРНК транскрибируются РНК-зависимой-РНК-полимеразой (VP1) и копируются метилгуанилтрансферазой (VP3) внутри субвирусной частицы. Все сегменты генома транскрибируются одновременно и многократно. Синтезированные мРНК покидают субвирусную частицу через поры [78, 197, 210].

Для продукции вирусных белков ротавирусы используют механизмы синтеза клетки-хозяина, которые переключаются белком NSP3. В клетке-хозяине только копированные и полиаденилированные мРНК могут быть эффективно транслированы. Хотя ротавирусные транскрипты копируются структурным белком VP3 во время эндогенной транскрипции, они не полиаденилированы. Ротавирусы группы А преодолевают отсутствие поли-А хвоста на мРНК, используя консенсусную последовательность (5'-GUGACC-3') на 3' конце [102].

Трансляцию вирусных мРНК, которые не имеют на 3' конце поли-А последовательности, облегчает протеин NSP3, функции которого аналогичны клеточному поли-А-связывающему белку (PABP). NSP3 вытесняет PABP из комплекса с эукариотическим фактором инициации трансляции клетки-хозяина eIF4G, что приводит к остановке трансляции клеточных мРНК [282].

Репликация генома. Синтез минус цепи РНК на матрице (+)РНК происходит в безмембранных цитоплазматических включениях, известных как вироплазма, в процессе первых стадий морфогенеза [44]. На ранних стадиях сборки ротавирусной частицы одиннадцать мРНК, соответствующих 11 сегментам генома, взаимодействуют с VP2, который образует внутренний белковый слой и является основой формирования полимеразных комплексов, что инициирует репликацию

вирусного генома [293]. После синтеза днРНК остается связанной с субвирусными частицами, что позволяет оградить клетку от наличия свободной днРНК [77, 230].

Сборка. В модели сборки ротавириона предполагают наличие 12 единиц, каждая из которых представляет собой пентамер, состоящий из димера VP2, комплекса VP1/VP3 и сегмента днРНК. Весь этот комплекс создает платформу для последующего добавления VP6, что приводит к образованию двухслойной частицы. При этом белковый комплекс NSP2/NSP5 участвует в упаковке генома [114].

Отличительной особенностью морфогенеза ротавируса является то, что субвирусные частицы, сборка которых осуществляется в вироплазме, почкуются через мембрану ЭПР, и созревающие частицы временно приобретают липидную оболочку. Это один из наиболее интересных аспектов ротавирусной репликации, отличающей их от других представителей семейства *Reoviridae*. Оболочка утрачивается и замещается VP7 и VP4, когда вирусные частицы движутся по направлению к внутренней части ЭПР [120].

Белок NSP4 играет ключевую роль в сборке трехслойной частицы. Этот протеин имеет несколько доменов и множество функций [47, 119]. NSP4 является виропоринном и повышает цитоплазматический уровень Ca^{2+} , необходимый для репликации и морфогенеза ротавириона [163]. Фолдинг белка VP7 происходит должным образом, только если он экспрессируется с другими ротавирусными белками. Ионы кальция должны присутствовать для правильного образования эпитопов VP7 [279].

Выход из клетки. С момента инфицирования клетки проходит от 6 до 15-24 часов, и инфекционный цикл заканчивается, когда вирусное потомство покидает клетку-хозяина путем ее лизиса. Обширный цитолиз на поздних этапах инфекции и резкое изменение проницаемости плазматической мембраны инфицированных клеток, приводят к высвобождению вирусного потомства. В результате лизиса клетки также освобождаются и вирусные белки, одним из которых является NSP4, играющий ключевую роль в патогенезе ротавирусной инфекции [120].

3 Формирование иммунного ответа на ротавирусную инфекцию

Для изучения иммунного ответа на ротавирусную инфекцию используют модели разнообразных животных (мышей, крыс, кроликов, свиней, телят, ягнят, приматов и др.). Наибольшее распространение получили модели мышей и свиней. Стоит отметить, что многие животные после первого инфицирования становятся устойчивыми к последующему симптоматическому заболеванию, а иногда и повторному заражению. С другой стороны, дети остаются восприимчивыми к РВИ по меньшей мере до трех лет, следовательно, данные, полученные на моделях животных, могут отличаться от иммунного ответа человека [104].

Вирусная репликация осуществляется в клетках тонкого кишечника – энтероцитах. Эти эпителиальные клетки в процессе инфицирования играют важную роль в инициации защиты хозяина путем освобождения определенных цитокинов и хемокинов, которые в дальнейшем запускают антиген-специфический иммунитет, опосредованный В- и Т-клеточным ответом. Вирусное потомство, образованное в слизистой оболочке кишечника, проникает в М-клетки, которые транспортируют вирусные антигены к антиген-презентирующим клеткам [243].

Ротавирусная инфекция характеризуется как системным (IgG и IgA), так и местным (IgA) антительным ответами. У детей с РВГЭ или бессимптомной инфекцией уровень сывороточных антител класса IgA (но не IgG) к ротавирусу коррелируют с защитой, показано, что высокий уровень IgA снижает тяжесть заболевания. В целом у людей и животных была обнаружена корреляция между уровнем сывороточных антител и защитной реакцией от болезни, однако она не абсолютна [37, 129, 174, 283]. Единственный случай, когда уровень антител сыворотки крови напрямую связан с защитой, касается новорожденных детей, когда трансплацентарно приобретенный гуморальный иммунитет, по-видимому, обеспечивает некоторую защиту от болезни в первые месяцы жизни [273].

Иммунная защита после перенесенной естественной РВ инфекции зависит от реинфекции, свойств вируса, иммунного статуса хозяина, а также

продолжительности вирусного контакта. Одна симптоматически или бессимптомно перенесенная инфекция обуславливает 87 % защиты против последующего развития тяжелого течения ОГЭ, две инфекции способствуют защите, близкой к 100 % [63, 311]. Возраст ребенка, и, следовательно, зрелость его иммунной системы, в момент первого инфицирования также будет играть роль в исходе второго контакта с вирусом. Иммуитет, формирующийся после перенесенной инфекции, является как гомо- так и гетеротипическим, хотя гомотипический ответ как правило сильнее. Гетеротипические антитела, способные нейтрализовать ротавирусы других G[P]-типов, свидетельствуют о наличии антигенов с перекрестно-реактивными вируснейтрализующими эпитопами [41, 140, 265].

Антитела, генерируемые против белков наружного капсида VP7 и VP4, эффективно нейтрализуют вирус. Считается, что белки VP4 и VP7 играют критическую роль при индукции иммунитета, что должно учитываться при разработке эффективных вакцин. Эти два протеина определяют серотиповую принадлежность ротавируса благодаря их способности вызывать антительный иммунный ответ. Считается, что нейтрализация VP4 (VP8*) связана с ингибированием связывания вируса с клеткой, тогда как нейтрализация VP7 ингибирует декапсидацию вируса. Исследования, проведенные среди людей, демонстрируют, что инфекция ограниченным числом серотипов VP4 и VP7 (в результате естественной инфекции или вакцинации) обеспечивает прочный гетеротипический защитный иммунитет. Однако основа формирования гетеротипической защиты не ясна [104].

Тример белка VP7 конформационно формирует антигенные эпитопы: 7-1 (20 а.о.) и 7-2 (9 а.о.). Поскольку эпитоп 7-1 формируется аминокислотными остатками на границе двух субъединиц VP7, его принято разделять на два участка 7-1a (14 а.о.) и 7-1b (6 а.о.) (Рисунок 3А). Для активации белка VP4 необходимо воздействие трипсина, который приводит к его протеолитическому расщеплению на VP8* и VP5*. Как показали рентгеноструктурные исследования, участок VP8* формирует

глобулярный домен, на котором находятся 4 антигенных эпитопа: 8-1 (11 а.о.), 8-2 (2 а.о.), 8-3 (9 а.о.) и 8-4 (3 а.о.) (Рисунок 3Б) [112].

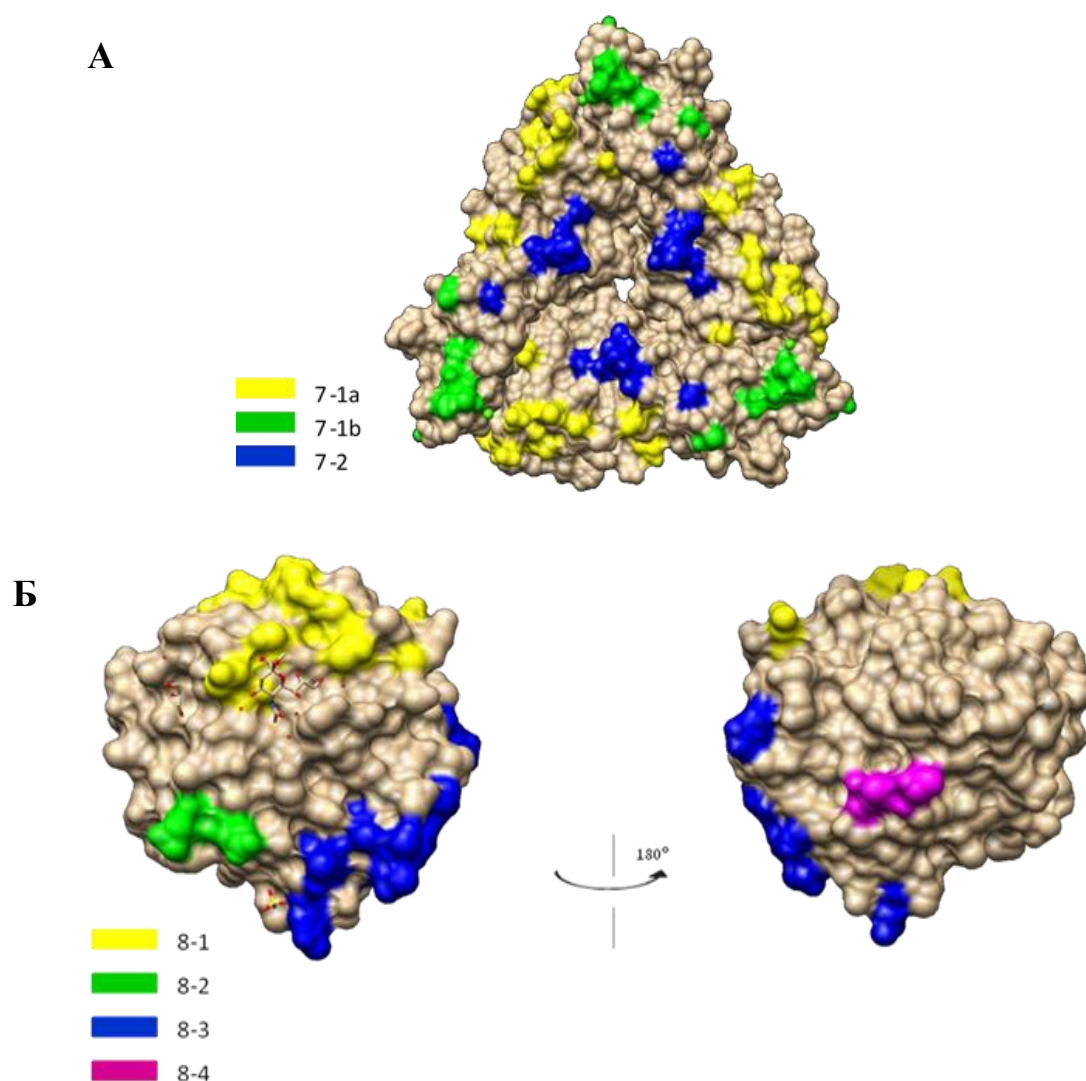


Рисунок 3. Поверхностное представление антигенных эпитопов на тримере VP7 (А) и глобулярном белке VP8* (Б). Нейтрализующие антигенные эпитопы показаны цветом на тримере VP7 (номер в базе данных PDB 3FMG) и домене VP8* (номер в базе данных PDB 1KQR) на моделях белков, полученных ранее при рентгеноструктурном анализе [39, 112].

Нейтрализующие антитела против VP4 и VP7 значимы при индукции иммунного ответа при оральной иммунизации или естественной инфекции, но не

только они играют защитную роль [322]. В качестве индукторов протективного иммунитета рассматривают белки VP6 и NSP4. Наибольший иммунный ответ В-клеток направлен против протеина VP6, который образует наружный слой двухслойной частицы и доступен только после проникновения вируса в клетку. На модели мышей было установлено, что моноклональные антитела класса IgA против VP6 были защитными, хотя они не имели традиционной активности нейтрализации *in vitro*. Эти антитела, вероятно, функционируют внутриклеточно, во время транскитоza через клетки эпителия кишечника, когда вирусная частица теряет наружный капсид, образованный VP7 и VP4, и белок VP6 становится доступен для антител [90, 123].

Исследования показывают, что антитела, секретируемые человеком, эффективно связывают двухслойные частицы, блокируя вирусную транскрипцию, тем самым отвечая за внутриклеточную нейтрализацию вируса [34]. В научной работе 2020 года на модели мышей было показано, что нейтрализация VP6-специфическими антителами класса G была намного эффективнее, чем VP6-специфическими IgA [71].

Это стоит особенно подчеркнуть, поскольку при оценке уровня защиты, как правило, измеряют уровень IgA. Помимо блокировки вирусной транскрипции, внутриклеточная нейтрализация репродукции связана с активностью рецептора внутриклеточных антител TRIM21. Рецептор TRIM21 представляет собой убиквитинлигазу E3 которая, активируясь, связывает Fc-часть цитозольных антител, связанных с вирусом, и катализирует аутоубиквитинилирование. После этого комплекс вирус-антитело направляется в протеасому для деградации [215]. В работе Aiyegbo с соавторами, были предложены два предполагаемых эпитопа на поверхности VP6 для внутриклеточных антител: А (231-260 а.о.) и В (265-292 а.о.) [34].

Поскольку белок VP6 становится доступен только после его проникновения в клетку, антитела должны поступать в цитоплазму независимо от процесса проникновения вируса. Известно, что IgA транспортируется от базолатеральной к

апикальной стороне эпителиальных клеток посредством pIgR³-опосредованного трансцитоза. Эндосомы, содержащие IgA, сливаются с вируссодержащими эндосомами, в результате чего образуются комплексы антитело-вирус. IgG также могут транспортироваться через эпителиальные клетки с помощью FcRn (неонатальный Fc-рецептор) после пиноцитоза на базолатеральной стороне энтероцита, сливаясь с эндосомой, содержащей вирус, и сопровождая его в цитозоль [107, 267].

Антитела играют значительную роль при защите от ротавирусной инфекции, но, кроме этого, другие составляющие иммунитета, такие как Т-клетки (CD4+ или CD8+), способствуют формированию протективного иммунитета при РВГЭ [128, 323]. После ротавирусной инфекции у детей в периферической крови обнаруживают Т-лимфоциты [247]. РВИ носит острый характер, возможно с этим связан низкий уровень Т-клеток памяти (по сравнению с длительными инфекциями, например, вызванными герпесвирусами). Кроме этого, у детей младшего возраста в связи с незрелостью иммунной системы, меньшая вероятность иметь циркулирующие клетки памяти [286]. Обследования детей после проведенной вакцинации против РВИ показывают высокую индивидуальную вариабельность развития клеточно-опосредованного иммунитета [216]. Для ряда белков РВА человека установлены Т-клеточные эпитопы: VP7 16-28 а.о. и 40-52 а.о.; VP6 341-349 а.о., 286-306 а.о. 301-315 а.о.; NSP4 114-134 а.о. [162, 177, 251, 325, 326, 339].

В связи с высоким генотиповым разнообразием ротавирусной популяции, важнейшая задача, возлагаемая на вакцины против ротавирусной инфекции - сформировать гетеротипический иммунный ответ. В настоящее время обе широко применяемые в мире вакцины Rotarix® и RotaTeq® эффективны в предотвращении тяжелого заболевания РВГЭ. Несмотря на достигнутый успех в области вакцинопрофилактики РВИ, существует необходимость в дальнейших исследованиях.

³ pIgR – полимерный рецептор иммуноглобулина.

4 Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции

4.1 История создания ротавирусных вакцин

Спор о важности нейтрализующих антител в защите после естественной ротавирусной инфекции привел к двум разным подходам в разработке живых вакцин против ротавируса. Первый подход основан на создании вакцин на основе отдельных штаммов РВА, второй – на реассортантных штаммах ротавируса, включающих несколько серотипов.

Вакцины первого поколения. Это поколение вакцин основано на подходах Дженнера, когда в качестве вакцинного штамма использовался моновалентный аттенуированный ротавирус животного. Такие вакцины при их применении не должны вызывать клинических проявлений у людей, но должны были формировать протективный иммунитет от дальнейших инфекций. К ним относились: RIT 4237, WC3 и RRV [57, 181, 312].

Первые испытания проводились всего через 10 лет после идентификации РВ в качестве инфекционного агента ОГЭ у детей младшего возраста, с использованием вакцины RIT 4237. Эта вакцина основана на бычьем штамме G6P[1] [312]. Тестирование вакцины в Финляндии показало ее высокую эффективность с уровнем защиты от тяжелого ГЭ 80 %. Тем не менее, результаты, полученные в дальнейшем в развивающихся странах, оказались разочаровывающими и испытания вакцины были прекращены [313].

Обезьяний ротавирус G3P[3] – RRV (rhesus rotavirus), был одним из первых вакцинных кандидатов, но защитные свойства, сформированные после применения этой вакцины также были не однозначны [127]. Серотип G3 является одним из доминирующих среди людей. Протективные свойства данной вакцины главным образом наблюдались тогда, когда G3 РВА доминировал на территории, где проводилась вакцинопрофилактика. В дальнейшем этот штамм был использован для создания вакцины второго поколения – Rotashield [275].

Вакцинный кандидат WC3 с генотипом G6P[5] относится к бычьим РВ и на первоначальных испытаниях способствовал формированию гетеротипического иммунитета, однако дальнейшие исследования не показали высокого уровня защиты [87]. Впоследствии, на базе этого штамма была создана вакцина RotaTeq®.

Таким образом, в развитых странах вакцины первого поколения показали высокую эффективность в отношении защиты от тяжелых случаев гастроэнтерита с суммарной эффективностью 73 % (95 % CI=51-85). В то же время суммарная эффективность этих вакцин в развивающихся странах, где вакцины являются критичными для спасения жизней, составила всего 20 % (95 % CI=0-39) [252, 288].

4.2 Современные вакцины

В настоящее время вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции внесена в национальные календари вакцинации 111 стран мира. По данным ВОЗ это позволило снизить смертность от РВГЭ с 528 тыс. в 2000 г. до 215 тыс. в 2013 г. В среднем снизив этот показатель у детей в возрасте до года на 40 % [327].

Вакцины второго поколения основаны на использовании реассортантных штаммов, где за основу взят ротавирус животного, в геном которого включен один или несколько генов (VP7 и/или VP4) ротавируса человека. Также это может быть аттенуированный ротавирус человека. Впервые в 1998 году в США была лицензирована тетравалентная вакцина второго поколения **Rotashield®** (Wyeth, Нью-Джерси, США) [275]. Она представляла собой реассортант ротавирусов человека и макаки-резуса. Rotashield была рекомендована к рутинной иммунизации детей в возрасте 2, 4 и 6 месяцев. В течение года она была введена около полумиллиону детей в США. Однако в 1999 году было показано, что эта вакцина ассоциирована с инвагинацией кишечника примерно в одном случае из 10 000, главным образом после первого введения. Вследствие этого Rotashield была отозвана с рынка производителем [75]. Тем не менее, вакцина показала высокую

эффективность во всех испытаниях, проведенных в развитых странах. Как и в случае с вакцинами первого поколения, Rotashield демонстрировала разную эффективность в развитых странах и странах с низким уровнем дохода [175].

RotaTeq® (RV5, Merck, США) – живая, оральная вакцина, пентавалентная, содержащая пять реассортантных штаммов ротавируса быка и ротавируса человека наиболее распространенных генотипов [88]. Для создания RotaTeq® использован штамм WC3 (G6P[5]) РВА быка и штаммы РВА человека: WI79-9, SC2-9, WI78-9, BrB-9 и WI79-4, соответственно G1, G2, G3, G4 и P[8] генотипов [88, 224]. Штамм SC2 был изолирован в 1981 году в США, штаммы WI79 и WI78 в 1983 году в США, BrB в 1984 году во Франции [224]. Три дозы этой вакцины рекомендованы для оральной иммунизации детей. Первая доза должна быть получена в возрасте 6-12 недель, далее с интервалом 4-10 недель. Весь курс должен быть закончен к возрасту 32 недели из-за роста риска инвагинации кишечника. Эффективность трех доз RotaTeq® в странах с низкой смертностью предотвращает 92 % случаев тяжелой ротавирусной диареи. В странах с высокой смертностью предотвращает 57 % тяжелых случаев РВГЭ [289].

Rotarix® (RV1, GlaxoSmithKline, Бельгия) рекомендована для рутинной вакцинации детей с 2006 года. Эта живая, оральная, моновалентная вакцина содержит аттенуированный ротавирус человека [314]. Вакцина Rotarix® получена на основе аттенуированного штамма 89-12 ротавируса человека с генотипом G1P[8], который был изолирован в США в 1988 году [324]. Rotarix® рекомендована к применению в двух дозах детям с 6-ти недельного возраста, с интервалом от 4-х недель. Полный курс должен быть закончен к возрасту 24 недели. В странах с низкой смертностью от РВГЭ, RV1 предотвращает 84 % случаев тяжелой ротавирусной диареи. В странах с высокой смертностью Rotarix® предотвращает 63 % случаев тяжелой ротавирусной диареи [289]. Во время первого года после вакцинации, эффективность двух доз Rotarix® против госпитализации с острой ротавирусной инфекцией составила 85 %, и против более тяжелого ротавирусного гастроэнтерита, определенного по 20-ти бальной шкале Везикари эффективность составила 100 % [280]. В целом, иммунизация детей одним штаммом РВ

обеспечивает существенную защиту от инфекции другими серотипами [99]. Применение двух доз оральной аттенуированной вакцины RV1 (основанной на штамме RIX4414) демонстрируют высокую эффективность против ротавирусного гастроэнтерита, вызванного современными штаммами РВА глобальных генотипов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) [43, 99, 289]. Другими словами, RV1 индуцирует заметную защиту от тяжелого заболевания, вызванного ротавирусом различными G[P] генотипов, не включенных в вакцину [212, 307].

Помимо Rotarix® и RotaTeq®, широко применяемых во всем мире, существуют региональные вакцины, используемые локально в отдельных странах:

- **Rotavac** – лицензирована в 2014 году для использования в Индии. Живая, аттенуированная моновалентная вакцина на основе штамма РВА с генотипом G9P[11], изолированного от ребенка в 1985 году [138]. Предотвращает 57 % тяжелых случаев РВГЭ на территории Индии [289];
- **Rotavin-M1**, разработана на основе штамма G1P[8] ротавируса человека и лицензирована для использования во Вьетнаме с 2007 года [96];
- **LLR** (Lanzhou lamb rotavirus) – создана на основе ротавируса ягнят G10P[12], применяется в Китае с 2000 года [131];
- **Rotasiil** – лиофилизированная пентавалентная вакцина, на основе реассортантных штаммов РВА человека и быка. Содержит серотипы G1, G2, G3, G4 и G9. Первая термостабильная вакцина, которая может храниться при комнатной температуре, в отличие от остальных вакцин, для эффективности которых необходимо строгое соблюдение холодовой цепи. Лицензирована в Индии [240];
- **RV3-BB** – живая ротавирусная вакцина на основе штамма G3P[6], идентифицированного в стуле детей с бессимптомной инфекцией [60]. Аттенуирована и адаптирована к кишечнику новорожденного естественным образом. Эффективно реплицируется, несмотря на наличие материнских антител и грудное вскармливание [72].

Применение аттенуированных вакцин имеет ряд сложностей при их использовании: высокая стоимость производства, жесткие условия

транспортировки и хранения, реассортация с вирусами дикого типа, возможность реверсии в вирулентные штаммы и т.д. [13]. Кроме этого, такое осложнение, как инвагинация кишечника, по всей видимости, связано с репликацией пероральной вакцины в кишечнике. Парентеральные вакцины успешно используются для профилактики заболеваний, вызванных такими мукозальными патогенами, как полиовирус, вирус гепатита А и холерный вибрион. С целью снижения стоимости и повышения эффективности вакцинации против ротавирусной инфекции группы ученых ведут разработки современных рекомбинантных вакцин. Например, рекомбинантные вакцины на основе аденовирусного вектора и белков VP4 с VP7 и VP7 с NSP4 показали стимуляцию иммунитета у мышей, как при внутримышечном, так и интраназальном введении [137, 329].

Вакцины на основе бактериальных векторов, например непатогенного штамма *Lactococcus lactis*, продемонстрировали эффективную стимуляцию иммунного ответа на ротавирусные белки VP7, VP4, VP8*, VP6 при их пероральном введении разным видам животных [116, 205, 218, 256].

ДНК-вакцины, кодирующие белки VP4, VP6, VP7, начали разрабатывать в середине 90-х годов прошлого века [79-81, 155-157, 331, 333]. Однако в последнее десятилетие новых данных, где были бы сообщены результаты разработок ДНК-вакцин против РВИ, представлено не было.

Один из перспективных подходов связан с получением нереплицирующихся вакцин на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ) ротавируса. ВПЧ лишены генетического материала и не инфекционны. Белок VP2 путем самосборки образует пустые частицы; VP2 и VP6 - двухслойную частицу; совместная экспрессия VP2, VP6, VP7 и VP4 (или без него) приводит к образованию трехслойной частицы, напоминающей инфекционную. Эффективность таких вакцин зависит от композиции белков ВПЧ, способа введения, адьюванта и вида животных [33, 45, 58, 92, 115, 130, 139, 168, 255, 285, 298, 303]. Хотя потенциальная вакцина на основе ВПЧ позволяет снизить стоимость вакцинации, многочисленные разработки находятся на стадии изучения и доклинических исследований.

Высококонсервативный белок внутреннего капсида вириона VP6 является как антигенным протеином, так и иммуногеном [89, 167, 294, 295, 299]. Нативная конформация VP6 в экспрессированном и очищенном белке является олигомером, что позволяет предположить олигомеризацию как внутреннее свойство белка. Дальнейшая сборка тримерных молекул в морфологические структуры происходит самопроизвольно, для этого не требуются взаимодействия с другими вирусными белками или субвирусными структурами [118]. Самоорганизующийся VP6, индуцирующий иммунный ответ, все чаще рассматривается как потенциальный кандидат на вакцину против РВИ [29].

Субъединичные рекомбинантные вакцины основаны на различных комбинациях белков ротавируса VP6, VP4 с другими протеинами и адъювантами [7, 83, 231]. По последним данным, наиболее успешной из рекомбинантных, является вакцина, полученная при экспрессии белка VP8* штамма ротавируса человека Wa (G1P[8]). Иммуногенность белка была повышена универсальным CD4(+)-Т-клеточным эпитопом столбнячного токсина P2. По результатам первой фазы клинических исследований парентеральной вакцины P2-VP8-P[8], адсорбированной на гидроксиде алюминия в качестве адъюванта, показана безопасность и иммуногенность у взрослых и детей разного возраста [124, 146].

Таким образом, живые вакцины против ротавирусной инфекции, широко применяемые в мире, хорошо зарекомендовали себя в развитых странах. Однако, сложности и риски, связанные с их применением, недостаточная эффективность в развивающихся странах, обуславливают необходимость разработки эффективной и безопасной рекомбинантной вакцины.

4.3 Эффективность вакцин в развитых и развивающихся странах

При применении вакцин Rotarix® и RotaTeq® не были зарегистрированы случаи инвагинации или другие побочные эффекты, при этом, оба препарата

показывали высокую эффективность (85-98 %) против развития тяжелых случаев ротавирусной инфекции [55, 98, 101, 250]. Стоит отметить, что эффективность вакцин в развивающихся странах составила от 51 до 64 % у детей в первый год жизни. Считается, что причин низкой эффективности вакцин в странах с низким уровнем дохода может быть несколько:

- интерференция с живой полиовирусной вакциной;
- более высокие титры материнских антител у младенцев;
- грудное вскармливание (нейтрализация вируса материнским молоком, важно, если во время вакцинации в ЖКТ ребенка есть материнское молоко);
- сопутствующие кишечные инфекции другими микробами;
- недостаток витаминов и минеральных веществ, таких как цинк, витамин А и др. [252, 274].

Проблема разного уровня иммунного ответа при применении вакцин была обнаружена еще в Индии при введении ОПВ (оральной полиовирусной вакцины) [178]. В работе John и соавторы показано, что иммунный ответ на ОПВ у детей на северо-востоке Индии значительно ниже, чем у детей на западе. Исследования эффективности оральной вакцины против холеры также показали, что взрослым жителям Индонезии и Таиланда для достижения сходного иммунного ответа требуется доза вакцины в 10 раз превышающая дозу, полученную добровольцами в США [203]. Исходя из этих данных, Patel с соавторами выдвинули предположение, что для достижения необходимой защиты от ротавирусной инфекции необходимо увеличить количество доз [252]. В связи с этим, ВОЗ рекомендует трехкратное применение обеих вакцин (несмотря на то, что производителем Rotarix® рекомендовано две дозы) [327].

Тем не менее, несмотря на более низкую эффективность в развивающихся странах, подавляющее число тяжелых гастроэнтеритов, вызванных ротавирусом человека, предотвратимо вакцинацией, что дало основание ВОЗ в 2009 году рекомендовать вакцинацию для глобального использования [327]. Стоит отметить наличие четкой связи между охватом вакциной населения, числом ротавирус-

положительных образцов и госпитализаций с РВГЭ. Положительный эффект от вакцинопрофилактики РВА пропорционален охвату населения [113, 261, 300, 310].

4.4 Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции в России

В России зарегистрирована вакцина RotaTeq®, применение которой регламентировано по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава России от 21.03.2014 №125н). Поскольку кишечные инфекции по затратам занимают третье место после острых респираторных инфекций и туберкулеза, а ротавирусную инфекцию хотя бы раз в жизни переносит каждый ребенок, необходим всесторонний анализ последствий, рисков, преимуществ и эффекта возможного введения вакцинации в национальный прививочный календарь Российской Федерации. Заболеваемость РВИ в России в 2016 году составляла 83,26 на 100 тысяч населения, снизившись до 70,26 на 100 тысяч населения в 2019 году. Наиболее высокие показатели заболеваемости в России зарегистрированы среди детей в возрасте 1-2 года (1092,74 на 100 тыс.) и до года (878,77 на 100 тыс.). В 2016 году охват вакцинацией против ротавирусной инфекции в Российской Федерации составил 1,97 % от целевой когорты (Государственный доклад "О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году"). По данным государственного доклада 2019 года, в России разработаны методики культивирования и инактивации ротавируса группы А человека, что послужит основой для создания высокоиммуногенной отечественной ротавирусной вакцины для детей (Государственный доклад "О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году").

По данным наблюдений, проводимых референс-центром по мониторингу за возбудителями ОКИ, в 11 субъектах Российской Федерации, совпадение выявленных генотипов ротавируса с включенными в пятивалентную вакцину

против ротавирусной инфекции штаммами, позволяет ожидать снижения уровня заболеваемости при внедрении массовой иммунизации детей раннего возраста против этой инфекции [26]. Однако в последние годы возросло количество штаммов с генотипом G9, который не входит в состав вакцины RotaTeq®, зарегистрированной в России. На данном этапе, охват вакцинацией против ротавирусной инфекции, проводимой по эпидемическим показаниям, не может оказать влияния на суммарные показатели заболеваемости в целом по стране.

Экономическая оценка введения массовой вакцинации в нашей стране показала существенное сокращение затрат на терапию как в амбулаторных условиях, так и в условиях стационара [19, 26, 206]. Союз педиатров России также рекомендует проведение вакцинации против РВИ. В настоящее время в рамках региональных программ проводят проекты вакцинации детей против РВИ: Москва, Тверь, Тюмень, Красноярск, Краснодар, Смоленск и др. Так, в Тюменской области был показан нисходящий тренд в период сезонного подъема инфекции и показан высокий уровень безопасности и эффективности программы иммунизации вакциной RotaTeq® [21].

Фактором, свидетельствующим о необходимости всестороннего изучения штаммов, циркулирующих на территории России, является зарубежное производство существующих вакцин. Во-первых, массовая вакцинация потребует вложения значительных средств. Во-вторых, всесторонний анализ штаммов, циркулирующих на территории нашей страны, необходим для оценки возможных случаев низкой эффективности вакцинопрофилактики и создания отечественных вакцин на базе современных российских штаммов.

4.5 Последствия массовой вакцинации

Массовая вакцинация против ротавирусной инфекции вакцинами RotaTeq® и Rotarix® проводится в 111 странах мира и количество стран, вводящих эти вакцины в национальный календарь прививок, продолжает расти [254].

Известно, что генотиповое разнообразие РВА колеблется в зависимости от территориальных и временных параметров, тем не менее, механизмы, обуславливающие эти колебания, до сих пор до конца не понятны. Есть данные, свидетельствующие, что гомотипический и гетеротипический иммунитет играет важную роль как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях [311]. Кроме этого, на генотиповой структуре РВА отражается ряд других факторов: миграция людей по всему миру, возникновение штаммов РВА с изменёнными генетическими и антигенными свойствами как результат точечных мутаций, реассортации сегментов генома, внутримолекулярной рекомбинации и межвидовой трансмиссии. Также могут играть роль обстоятельства, облегчающие трансмиссию РВА, потенциально являющихся причиной вспышек, например формирование детских коллективов [226].

Относительное влияние массовой вакцинации, по сравнению с естественными факторами среды, на флуктуацию циркулирующих РВА сложно оценить. Однако необходимо принимать во внимание тот факт, что вакцинация детей проводится конкретными штаммами РВА, что приводит к однонаправленному давлению и потенциально способствует формированию штаммов максимально далеких от вакцинных [35]. Существует предположение, что под воздействием массовой вакцинации число случаев ОГЭ, вызванных РВВ и РВС, будет расти, главным образом за счет снижения доли инфекций, вызванных РВА. Несмотря на то, что моновалентная вакцина Rotarix® показала высокую эффективность при защите от тяжелых случаев гастроэнтерита, вызванных G2P[4], тем не менее, есть мнение, что по мере увеличения охвата вакцинацией, относительное число и распространенность этих штаммов будет расти. Этот вывод был сделан на основе

наблюдений в Бельгии, где после вакцинации отмечен рост числа случаев РВГЭ, вызванных ротавирусом с генотипом G2P[4]. На территории Австралии, где на протяжении двух сезонов 2007-2009 гг. применялась вакцина Rotarix®, было показано относительное увеличение штаммов с генотипом G2P[4], по сравнению со штатами, где применялась вакцина RotaTeq®, и в сравнении с предыдущими сезонами. Однако эта тенденция не наблюдалась в период 2009-2010 гг. Более того, в этот сезон, на территориях применения Rotarix®, относительная доля штаммов с генотипом G2P[4] была меньше (в сравнении с территориями, где применялась вакцина RotaTeq®). В Бразилии значительное увеличение относительной доли штаммов РВА с генотипом G2P[4] совпало с введением в 2006 году вакцины Rotarix®. Вспышки были отмечены во многих госпиталях, других лечебных учреждениях, пенитенциарных учреждениях. Кроме этого, были отмечены вспышки ОГЭ, вызванные РВА с генотипом G2P[4] в странах без введения вакцинной программы против ротавирусов. Все это позволяет сделать предположение, что увеличение доли РВА с генотипом G2P[4] в типовой структуре популяции ротавируса связаны с естественной флуктуацией циркулирующих генотипов, а не с введением вакцины [73].

После введения вакцинации в Австралии, появились данные о росте относительной пропорции штаммов G3P[8]. В штатах, где применялась вакцина RotaTeq®, доля G3P[8] составила 19,5 %, по сравнению со штатами, где применялась Rotarix® – 5,9 %. Эта динамика была отмечена в первые два сезона 2007-2009 гг. введения вакцинации [188]. Тенденция сохранилась и в следующем сезоне 2009-2010 гг. в штатах с применением RotaTeq® – 12 % G3P[8], по сравнению со штатами, где применялась Rotarix® – 2 % G3P[8] [187]. Однако в следующем сезоне 2010-2011 гг. наблюдался сходный процент выявления G3P[8] (около 10 %) на всей территории, вне зависимости от применяемой вакцины [188].

В США было показано, что штаммы генотипа G1P[8] доминировали в сезоны 2005-2006 гг. и 2006-2007 гг. на уровне 51,2 и 78,7 %, соответственно. Штаммы с генотипом G3 циркулировали на уровне 1,5 % в этот же временной период. После введения вакцинации процент штаммов с генотипом G1P[8] упал до уровня 30,7 %,

а штаммы с генотипом G3P[8] стали преобладать и достигли уровня 36,3 % в сезон 2007-2008 гг. [164]. Причины, по которым на территориях применения вакцины RotaTeq® наблюдалось увеличение штаммов с генотипом G3P[8], остаются не ясны. Возможно, это связано с низким гуморальным иммунным ответом к G3 компоненту вакцины RotaTeq®. Это может быть связано с сайтами гликозилирования на VP7, которые присутствуют в современных штаммах и могут способствовать ограждению части эпитопов от нейтрализующих антител [198]. Следует отметить, что в ряде азиатских стран также наблюдалось увеличение доли штаммов генотипа G3P[8] (до 73 % в Японии) при отсутствии проведения вакцинации против РВА [183].

Таким образом, в настоящее время в мире широко применяют две живые аттенуированные вакцины, эффективность которых выше в развитых странах. В Китае, Индии и Вьетнаме лицензированы местные вакцины, еще несколько препаратов проходят клинические испытания по всему миру, включая нереплицирующиеся вакцины. Применяемые на сегодняшний момент меры вакцинопрофилактики не защищают от инфицирования ротавирусом, но существенно снижают тяжесть течения болезни, позволив более чем на 40 % снизить смертность от РВГЭ по сравнению с до-вакцинным периодом. В условиях вакцинопрофилактики ротавирусы продолжают циркуляцию, формируют доминирующие типы и эпидемические варианты, которые перераспределяются во времени и пространстве.

5 Филодинамические подходы к изучению вирусов

Глобализация кардинально изменила скорость распространения патогенных микроорганизмов среди населения [82, 199]. Миграция, путешествия, торговля и другие мероприятия позволяют вводить новые для экосистем патогены с потенциально катастрофическими последствиями [149]. Последние годы были

отмечены глобальными эпидемиями лихорадок Эбола, денге и Зика, коронавируса, вызванные агентами, которые ранее ограничивались локальными вспышками [161, 277, 284, 297]. Эпидемиологические стратегии были и остаются первой линией защиты для локализации и предотвращения вспышек и эпидемий.

Термин «Филодинамика» был введен в 2004 году Grenfell с соавторами для описания «сочетания иммунодинамики, эпидемиологии и эволюционной биологии», необходимого для «выяснения того, как генетическое разнообразие, модулированное иммунитетом хозяина, трансмиссия патогена и динамика эпидемии определяют широкий спектр филогенетических патогенов, наблюдаемых в масштабах от отдельного хозяина до популяции» [145]. В основе этого сочетания лежит разработка новых математических моделей и статистических схем, необходимых для улучшения понимания динамики распространения инфекционных заболеваний. В частности, филодинамический анализ позволяет связать информацию о генетическом разнообразии с течением времени, пространственно-временное распространение вирусов и эволюцию фенотипических признаков.

Недавние разработки в области филогенетических методов сделали возможным оценить экологическую историю патогена на основе филогенетического анализа. Реконструкция на базе метода коалесценции (от англ. «слияние») при подобранных параметрах скорости эволюции, может предоставить информацию о происхождении и времени изменений в популяции патогенного агента [318].

Филогенетические методы также предоставляют такую информацию, как генотипические и фенотипические характеристики и лекарственная устойчивость. Хотя филогенетические подходы лимитированы в определенных областях, например, анализом данных только документировано инфицированной популяции, значительная часть этих ограничений может быть преодолена путем дополнительного использования данных эпиднадзора и мониторинга [153].

Филогенетические методы принципиально отличаются от методов, основанных на теории коалесценции, хотя и в том, и в другом случае происходит

построение дерева. При анализе данных на основе коалесценции, дерево строится стохастически, т.е. случайно, путем многих итераций (повторений), в попытке быстрее найти оптимальное решение. При построении филогенетического дерева, используют эвристические методы, когда комбинации подбираются не случайно, а в соответствии с каким-то алгоритмом (например, максимального правдоподобия или объединения ближайших соседей). Филогенетический подход может быть использован для разных видов или для одного вида. Однако, результаты, полученные при филогенетическом анализе, нельзя экстраполировать на всю изучаемую популяцию. При применении теории коалесценции возможно использование дополнительных данных, например временные параметры, возрастную структуру, распределение полов, географическое распределение, что позволяет глубже изучать эволюцию исследуемых образцов.

Оценка филодинамических параметров. Интеграция филогенетических методов с традиционными эпидемиологическими методами помогает установить взаимосвязь между данными эпидемиологического надзора и закономерностями изменений популяции патогена в динамике, такими, как генетическое разнообразие, избирательное давление, пространственно-временное распределение. Систематический анализ этих взаимосвязей, или филодинамика, предлагает уникальный взгляд на эпидемиологию инфекционных заболеваний, позволяя исследователям лучше понять влияние на эволюцию, например, пространственно-временную дисперсию (филогеографию) среди населения хозяина и передачу патогенного агента [191, 201, 265]. Последнее десятилетие характеризуется технологиями, позволяющими быстро получать молекулярные данные для идентифицируемых объектов с подробной релевантной информацией, что позволяет объединить филодинамику и эпидемиологию [266].

Филогеография, являясь одной из составляющих филодинамики, позволяет связать филогенетическую информацию с пространственно-временным распространением патогена и проиллюстрировать эпидемические связи между патогенами с разных территорий на основе генетических данных, воссоздав пути их миграции [318].

Распространение вирусов. Применение филодинамических моделей может обеспечить понимание эпидемических параметров, которые трудно оценить с помощью традиционных средств наблюдения. Например, оценка R_0^4 по данным эпиднадзора требует тщательного контроля за изменением уровня отчетности и интенсивности наблюдения. Анализ демографической истории вирусной популяции из генетических данных может помочь избежать этих трудностей и обеспечить отдельный путь для расчёта R_0 [316]. Такие подходы были использованы для оценки R_0 вируса гепатита С и ВИЧ [264, 316]. Стоит отметить, что дифференциальную передачу между группами, будь то географическая, возрастная или группа риска, очень сложно оценить только по данным эпиднадзора. Филогеографические модели имеют возможность более прямого выявления этих скрытых схем передачи [317]. Однако, нерепрезентативная выборка может смещать выводы как по R_0 , так и модели миграции [56, 290].

В нашей стране ряд научно-исследовательских групп проводят филодинамические исследования патогенных агентов. В работе Лукашева с соавторами 2018 года приведены данные, полученные в ходе анализа вируса Конго-крымской геморрагической лихорадки, являющегося причиной спорадической заболеваемости на юге России [211]. Расчеты показали высокую динамику передачи патогена на большие расстояния и активную реассортацию сегментов генома. Полученные данные могут быть использованы для прогнозирования распространения этого патогена в южной Европе. Анализ вируса гепатита С показал, что завоз одной из линий этого вируса (сублинии 3), был осуществлен в СССР в начале 80-х годов прошлого века [217]. На полученных данных будет базироваться дальнейший анализ истории социальных и географических групп передачи гепатита С, полученные сведения также необходимы для понимания глобальной эволюции этого вируса.

⁴ R_0 (Базовый показатель репродукции) - количество лиц, зараженных одним инфицированным лицом на протяжении всего заразного периода при условии контакта с полностью восприимчивой популяцией, как это бывает на ранних стадиях эпидемии.

Активные эволюционные процессы в популяции РВА можно оценить, основываясь на таком филодинамическом показателе, как скорость накопления мутаций. В публикации 2010 года было показано, что скорость накопления мутаций у одного из в то время редких генотипов ротавируса (G9) была выше, чем у других генотипов [225]. Авторы работы предположили, что это приведет к быстрой адаптации этого варианта и его распространению среди людей. В настоящее время, этот генотип является одним из наиболее распространенных в мире. В 2011 году ротавирусы с генотипом G9 впервые были обнаружены и описаны на территории Нижнего Новгорода [9].

Таким образом, к настоящему времени получены достаточно полные, хотя и не исчерпывающие, сведения о разнообразии ротавирусов на основе бинарной и полногеномной классификаций, молекулярно-биологических свойствах ротавирионов, формировании иммунного ответа при ротавирусной инфекции, вакцинопрофилактике. Настоящая работа посвящена изучению генотипового разнообразия ротавируса А на территории Нижнего Новгорода в 2016-20 гг., полногеномной характеристике штаммов с генотипами G4P[8] и G2P[4], сравнительному анализу филогенетических свойств и антигенного состава в области конформационных и линейных эпитопов вакцинных и российских штаммов дикого типа ротавирусов вида *Rotavirus A*.

II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1 Исследуемый материал

Образцы биоматериала

В работе с целью выявления ротавирусов было исследовано 6100 образцов копроматериала детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острая кишечная инфекция. Обследование детей проводилось с информированного согласия родителей.

Образцы биоматериала, содержащие ротавирусы, использовали для изучения возбудителя:

1. Методом РНК-ПААГ исследован 1661 ротавируссодержащий образец.
2. Методом мультиплексной ОТ-ПЦР для определения G[P]-генотипа исследован 1661 ротавируссодержащий образец.
3. Ретроспективно исследовано 80 ротавируссодержащих образцов, выявленных в период 2013-15 гг.

Последовательности нуклеиновых кислот:

1. Методом секвенирования по Ф. Сенгеру определена нуклеотидная последовательность 124-х фрагментов кДНК гена VP7, 48-ми фрагментов кДНК гена VP4, 30-и фрагментов кДНК гена VP6 и 15-ти фрагментов кДНК гена NSP4. Всего 217 фрагментов кДНК, которые зарегистрированы в международной базе GenBank, регистрационные номера представлены в Приложении.

2. Для сравнительного *филогенетического анализа* вакцинных штаммов РВА и российских ротавирусов дикого типа были исследованы 346 последовательностей гена VP7, 480 последовательностей гена VP4, 262 последовательности гена VP6 и 89 последовательностей гена NSP4, последовательности соответствующих генов штаммов РВА в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq®, доступные в базе данных GenBank.

3. Методом NGS (Next-Generation Sequencing – секвенирование нового поколения) определены полные нуклеотидные последовательности генома двух штаммов РВА генотипов G2P[4] и G4P[8], которые депонированы в базе данных GenBank (регистрационные номера MN206117-MN206138).

На основе полного генома данных штаммов РВА проведен *филогеографический анализ*. Для каждого сегмента генома была составлена отдельная выборка, включающая исследуемый образец и штаммы, доступные в базе данных GenBank. Для реконструкции географического распространения штамма с генотипом G4P[8] было исследовано более 18 тысяч последовательностей, с генотипом G2P[4] более 8 тысяч нуклеотидных последовательностей ротавирусов, изолированных по всему миру. Нуклеотидные последовательности, доступные в базе данных GenBank на январь 2019 года с известной датой выделения образца, местом (страной) изоляции, необходимой длиной последовательности (более 80 % открытой рамки считывания) были отобраны с использованием приложения Virus Variation [151].

Аминокислотные последовательности и модели белков

1. Для сравнительного анализа аминокислотного состава в области антигенных детерминант вакцинных штаммов РВА и российских ротавирусов дикого типа были исследованы 346 выведенных аминокислотных последовательностей VP7, 480 последовательностей VP4, 262 последовательности VP6 и 89 последовательностей NSP4 и соответствующие аминокислотные последовательности белков в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq®.

2. Используются структурные модели домена VP8* и белка VP7, доступные в PDB (Protein Data Bank) под номерами PDB 1KQR и PDB 3FMG, соответственно. Анализ антигенных сайтов трехмерной модели глобулярного домена VP8* белка VP4 и тримера VP7 был проведен с использованием программы Chimera [258].

2 Методы

2.1 Подготовка биоматериала для исследования

К 0,3-0,5 г полученного копро-образца, добавляли 3-5 мл стерильного физиологического раствора и интенсивно вортексировали. Затем 10 % суспензию центрифугировали в течение 3 минуты при 10 тыс. g. Супернатант использовали для экстракции нуклеиновых кислот для ОТ-ПЦР и проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Работа проводилась в соответствии с СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней".

2.2 Выявление РНК ротавируса из образцов биоматериала

Выделение РНК ротавируса из клинического материала осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции по применению.

Обратную транскрипцию проводили с использованием комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-Л» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции по применению.

Обнаружение РНК ротавируса проводили с использованием набора реагентов для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (Rotavirus A), норовирусов 2 генотипа (Norovirus 2 генотип) и астровирусов (Astrovirus) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции по применению.

Аmplификацию и анализ результатов проводили на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия) в режиме реального времени.

2.3 Электрофорез РНК ротавирусов в полиакриламидном геле (РНК-ПААГ)

Для электрофоретипирования днРНК ротавируса, экстракцию проводили из 700 мкл фекальной суспензии. Добавляли 200 мкл буферного раствора, содержащего 0,03 М CH_3COONa , 0,9 М NaCl , 0,012 М ЭДТА, 3 % ДСН, рН 5,0-5,2. Тщательно перемешивали, инкубировали 10 минут при 65°C , охлаждали при -20°C в течение 30 минут и центрифугировали 15 минут при 10 тыс. г. Далее, 800 мкл супернатанта переносили в чистые пробирки и добавляли 0,6 объема изопропанола и 0,1 объема ацетата натрия. Тщательно перемешивали и центрифугировали при 10 тыс. г. Супернатант убирали, осадок промывали 96 % этанолом и центрифугировали 15 минут при 10 тыс. г. Удаляли супернатант и высушивали осадки 30 минут, при 37°C . Осадки растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера и центрифугировали 1 минуту при 10 тыс. г. Супернатант, содержащий РНК ротавирусов, использовали для проведения электрофореза в ПААГ. Выделенную РНК хранили при температуре -20°C .

Электрофорез РНК ротавирусов проводили в слое 3 % разделяющего и 10 % концентрирующего гелей с использованием системы буферных растворов Лэммли в течение 18 часов при 10 мА [195].

По окончании электрофореза, гель промывали дистиллированной водой и помещали на 40 минут в 0,19 % раствор нитрата серебра. После чего промывали водой от 3 до 5 раз. Затем гель погружали в восстанавливающий раствор (0,75 М NaOH , 0,3 % формальдегид) до появления окраски. Реакцию останавливали, погружая гель в 5 % раствор уксусной кислоты [154].

В пробах, содержащих РНК РВА, наблюдали характерный профиль миграции сегментов генома, состоящий из 4-х групп. Анализ распределения сегментов и присваивание электрофоретического типа проводили в соответствии со схемой, ранее разработанной в лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций [8].

2.4 Генотипирование ротавирусов методом мультиплексной ПЦР

Проведение полимеразной цепной реакции. Определение G и [P]-генотипов осуществляли методом мультиплексной ПЦР, с использованием праймеров, синтезированных ЗАО «Синтол» (Москва) (Таблица 4). Для G-генотипирования использовали общий прямой праймер (VP7F) и восемь обратных специфических праймеров (G1R, G2R, G3R, G4R, G6R, G8R, G9R, G12R). Для определения [P]-типа использовали общий прямой праймер (con3) и четыре обратных специфических праймера (P[4], P[8], P[6], P[9]).

Реакцию проводили в объеме 15 мкл с использованием реактивов производства ЗАО «Силекс» (Москва). Готовили реакционную смесь из расчета на одну пробирку: 7,8 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз, 3 мкл ПЦР-буфера, содержащего 15мМ Mg^{2+} , 0,9 мкл смеси дНТФ, по 0,1 мкл прямого и обратного праймера, 0,1 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл). К смеси добавляли 3 мкл кДНК. Пробирки инкубировали в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Москва). Для определения генотипа VP7 амплификацию выполняли по программе: 95°C – 1 мин, (95°C - 10 сек, 57°C – 10 сек, 72°C – 10 сек) – 42 цикла, 72°C – 5 мин. Для определения генотипа VP4 программа амплификации имела вид: 95°C – 1 мин, (95°C - 10 сек, 55°C – 10 сек, 72°C – 10 сек) – 42 цикла, 72°C – 5 мин. Для секвенирования фрагменты кДНК нарабатывали в объеме 30 мкл.

Таблица 4. Последовательности праймеров, использованных для определения G-генотипа и P-генотипа РВА методом мультиплексной ПЦР

Ген	Название праймера	Последовательность 5' – 3'	Регион посадки праймера (н.о.)	Литература
VP7	VP7F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	51-71	169
	G1R	TYTWGTYAAGGCAAATAATG	176-195	97
	G2R	GTTAGAAATGATTCTCCACT	262-281	97
	G3R	CYTTWATWGTACAWGATGATCCC	600-622	142
	G4R	RTTTTGGTTCGATGGAAAATTC	427-448	97
	G6R	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	499-481	121
	G8R	CGGTTCCGGATTAGACAC	273-256	121
	G9R	TATAAAGTCCATCGCRCTAG	128-147	97
	G12R	CCGATGGACGTAACGTTGTA	548-567	49
VP4	Con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32	134
	P[4]R	CYATTATTAGAGGTAAAGTCCG	472-494	134
	P[6]R	TTGAATCCAACТААТCAACAAG	259-280	134
	P[8]R	ATCTACTGGATYGACGTGYGG	337-357	134
	P[9]R	TTAGTGCAACCAACTCTTGAT	187-207	134

Детекция полученных результатов методом электрофореза в агарозном геле.

Полученные в результате ПЦР фрагменты кДНК анализировали с использованием электрофореза в 1 % агарозном геле, с добавлением бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере, заполненной трис-боратным буфером с pH 8.3, при напряжении 150-200 V в течении 15-20 минут.

Для секвенирования полученных фрагментов кДНК проводили очистку с использованием набора «ФБиоГель» (произведено «Фрактал Био», Санкт-Петербург), согласно рекомендациям производителя.

2.5 Определение нуклеотидной последовательности кДНК

Секвенирование по Ф. Сенгеру. Первичные нуклеотидные последовательности полученных фрагментов устанавливали в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 и

набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США), согласно рекомендациям производителя. Определение первичной структуры фрагмента кДНК генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 осуществляли по двум цепям с прямым и обратным праймерами (Таблица 5).

Таблица 5. Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов VP7, VP4, VP6 и NSP4

Ген	Название праймера	Последовательность 5' – 3'	Регион посадки праймера (н.о.)	Литература
VP7	VP7F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCG	1-23	222
	VP7R	GGTCACATCATACAATTCTAATC	1040-1062	
VP4	con3mod	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32	133
	con2	ATTTCCGGACCATTTATAACC	868-887	
VP6	GEN_VP6F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1-20	222
	GEN_VP6R	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1356	
NSP4	GEN_NSP4F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTC	1-21	
	GEN_NSP4R	GGWYACRYTAAGACCRITTC	732-751	

Высокопроизводительное секвенирование. При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT Sample Preparation kit (Illumina, США), анализ проводили с использованием набора MiSeq reagent kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов. Выравнивания нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Визуализацию и анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения UGENE Unipro и MEGA5.

2.6 Филодинамический анализ на основе нуклеотидных последовательностей

Филогенетический анализ. Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения MEGAX [193]. Расчёт гомологии нуклеотидных последовательностей проводили в программе UGENE [249]. Филогенетический анализ был проведен с использованием пакета программ BEAST v.1.10.4 [292]. В частности, процесс замещения нуклеотидов оценивали с помощью модели Хасегава-Кишино-Яно (HKY, Hasegawa-Kishino-Yano). Скорость эволюции измеряли на базе нестрогих (свободных) логнормальных часов. Для достижения значений эффективного размера выборки (ESS) более 200 длина цепи Маркова (MCMC, Markov chain Monte Carlo) составила 20-80 млн. шагов. Визуализация и обработка филогенетических деревьев проведена в программе FigTree v.1.4.3.

Филогеографический анализ. Дискретный филогеографический анализ был проведен с использованием пакета программ BEAST v.1.10.4. Пространственная визуализация полученных результатов на карте осуществлялась в программах SPREAD v.1.0.6 и Google Earth. Визуализация филогенетических деревьев проведена в программе FigTree v.1.4.4.

Расчет филодинамических характеристик и статистический анализ. Расчет динамики демографических показателей выполнен с использованием модели SkyGrid [159]. Анализ выходных MCMC-файлов, а также визуализацию популяционной динамики осуществляли в программе Tracer v1.7.1 [272]. Расчет байесовского фактора выполнен в программе SPREAD [59]. Статистическую значимость различий частоты обнаружения ротавирусов в разные сезоны и долевого распределения штаммов разных генотипов определяли с использованием критерия χ^2 [4].

III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Характеристика типовой структуры нижегородской популяции ротавируса

Мониторинг циркуляции ротавирусов проводят в лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной начиная с 1984 года. Настоящая работа является логическим продолжением многолетних наблюдений за популяцией РВА на одной территории без вакцинного давления.

1.1 Спектр G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в период 2016-2020 гг.

В изучаемый период 2016-20 гг. с использованием метода ОТ-ПЦР и РНК-ПААГ с целью выявления РНК ротавируса, нами было исследовано 6100 копро-образцов, полученных от детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острая кишечная инфекция. В среднем, ротавирусы были обнаружены в 27,2 % (21,6 - 31,5 % в зависимости от сезона) случаев (Таблица 6). В предыдущие годы, частота обнаружения РВА в образцах стула детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде находилась на уровне 25 % [10]. В нашем исследовании в период 2016-2017 частота обнаружения ротавирусов составила 31,5 %, затем в сезон 2018-19 гг. произошло статистически значимое снижение этого показателя до 21,6 % ($p < 0,001$).

Таблица 6. Обнаружение ротавирусов у детей, госпитализированных в Нижнем Новгороде в 2016-20 гг.

Годы (сезоны)	Обследовано (абс.)	Обнаружено	
		абс.	%
2016-17	1574	496	31,5
2017-18	1558	476	30,6
2018-19	1582	341	21,6
2019-20	1386	348	25,1
Всего	6100	1661	27,2

Образцы, содержащие РНК РВА, были типированы методами мультиплексной ПЦР и секвенированием на предмет выявления 12-ти наиболее распространенных в мире генотипов: G1, G2, G3, G4, G6, G8, G9, G12, P[4], P[8], P[6], P[9]. Долевое распределение глобальных типов нижегородских РВА представлено в таблице 7.

Таблица 7. Распределение типов РВА, идентифицированных в Нижнем Новгороде в 2016-20 гг.

Сезон	Число типирован ных изолятов (абс.)	G[P]-типы РВА (%)						
		G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G4P[8]	G9P[8]	G12P[8]	Другие
2016-17	388	9,0	5,9	0	16,0	63,2	0,3	5,6
2017-18	279	12,5	22,9	5,0	13,3	40,6	0	5,7
2018-19	256	4,3	39,1	0,8	10,2	27,7	0	17,9
2019-20	300	2,7	22,3	4,7	2,0	58,0	0	10,3
2016-20	1223	7,1	22,5	2,6	10,4	47,4	0,1	9,9

В таблице видно, что в период 2016-20 гг. были обнаружены шесть глобальных генотипов, на долю которых пришлось 90,1 %. Основную долю в

типовой структуре нижегородских РВА представили генотипы G9P[8] и G2P[4]. РВА генотипов G4P[8] и G1P[8] снизили активность циркуляции.

Данные генотипового разнообразия РВА на территории Российской Федерации в изучаемый отрезок времени представлены мало. В Оренбургской области в сезоны 2013-2017 гг. выявлены генотипы G4P[8] (56,9 %), G9P[8] (12,9 %), G2P[4], G1P[8], G3P[8], G3P[9] и G12P[8] (в сумме 30,2 %) [1, 6]. По данным референс-центра по мониторингу за возбудителями ОКИ (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора), в 11 субъектах РФ (Московская, Томская, Нижегородская, Иркутская, Свердловская, Новосибирская, Оренбургская области, Камчатский и Хабаровский края, Республика Дагестан, Ненецкий автономный округ) в 2016 г. сохранялось превалирование ротавирусов группы А генотипа G4P[8] и отмечена тенденция к снижению частоты выявления G3P[8]-генотипа и увеличению доли G9P[8] [14]. В Москве в 2018-2019 гг. преобладающими были два генотипа - G9P[8] (39,0 %) и G4P[8] (29,3 %), также были обнаружены G2P[4], G1P[8], G3P[8], G12P[8], G3P[9] [172].

Исходя из растущего числа сообщений, как из развитых, так и из развивающихся стран об обнаружении штаммов с генотипом G12 [268, 306], вполне возможно, что этот РВА вскоре будет доминировать на глобальном уровне. В Нижнем Новгороде РВА с генотипом G12P[8] был впервые обнаружен у ребенка в ноябре 2016 года и пока относится к редким вариантам на территории нашей страны. В 2016-17 гг. и 2017-18 гг. G12P[8] преобладал в типовой структуре ОКИ в Италии и Финляндии [166, 219]. Иногда появление в генотиповой структуре РВА штаммов G12 в комбинации с P[6] или P[8] связывают с вакцинацией RotaTeq®, как, например, на территории Бразилии, Австралии [147, 276].

Кроме глобальных генотипов, на территории Нижнего Новгорода в период 2016-2020 гг. нами были определены минорные комбинации G и P генотипов РВА: G9P[4], G3P[9] (в период 2016-17 гг.); G9P[9] (в период 2017-18 гг.); G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[9] (в период 2018-19 гг.); G4P[6], G8P[8], G2P[8], G3P[4] (в период 2019-20 гг.).

Штаммы с редкими G[P]-типами в основном рассматриваются как зоонозы и в развивающихся странах могут быть частыми причинами инфекций у детей в связи с их контактами с животными. Как правило, это спорадические случаи, которые, однако, могут достичь эпидемиологической значимости в некоторых географических регионах, вероятно, вследствие реассортации РВА и накопления мутаций [220]. Генотипы необычных штаммов широко варьируют в разных регионах, и остается неясным будут ли такие штаммы распространяться в глобальном масштабе. Например, ротавирусы с генотипом G9P[8] пока представляют единственный пример того, как ранее редкая комбинация стала доминировать в мировом масштабе. В Нижнем Новгороде штаммы с генотипом G9 впервые были обнаружены в 2011 г., а в 2016 г. стали доминирующими в генотиповой структуре РВА. Следует отметить, что штамм с генотипом G9 не входит в вакцины RotaTeq® и Rotarix®.

Все больше сообщений появляется об обнаружении ротавирусов с генотипом G8 во многих странах мира: Таиланде, Японии, Вьетнаме, Турции, Австралии, Иране и других [67, 148, 160, 182, 190, 276]. В ноябре 2018 года нами был обнаружен штамм с генотипом G8P[8] с коротким профилем миграции геномной РНК в ПААГ, что является признаком DS-1 подобных штаммов. В сезон 2019-20 гг. было выявлено 7 таких штаммов с генотипом G8P[8]. Впервые DS-1-подобный G8P[8] штамм был изолирован от ребенка с острой диареей в Таиланде в 2013 году [296, 332]. DS-1-подобный ротавирус G8P[8] также был изолирован в 2017 году на территории Японии [179]. В Чили ротавирусы G8P[8], близкие азиатским штаммам, в 2016-18 гг. заняли доминирующее положение [208].

Таким образом, типовая структура популяции ротавируса на территории Нижнего Новгорода в 2016-20 гг. при отсутствии массовой вакцинации включала глобально распространенные генотипы: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8] и штаммы с необычными комбинациями G- и [P]- генотипов: G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6]. Ротавирусы с генотипом G6 в исследуемый период не были выявлены. Зафиксировано снижение частоты

обнаружения РВА с 31,5 % в 2016-17 гг. до 21,6 % в 2018-19 гг., на фоне снижения частоты обнаружения ротавирусов с генотипом G9 и ростом доли РВА G2P[4].

1.2 Характеристика штаммов с генотипом G2P[4], изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг.

Ротавирусы с генотипом G2P[4] как правило, имеют «короткий» профиль миграции сегментов генома в ПААГ и относятся ко второй геногруппе РВА. Снижение частоты обнаружения ротавирусов (Таблица 5) и статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение доли штаммов с генотипом G2P[4] в период 2018-19 гг., послужили основанием для молекулярно-генетического исследования этих изолятов.

Генотип G2P[4], как правило, входит в типовую структуру популяции РВА, но редко доминирует. Анализ генотиповой структуры РВА, проведенный в Австралии в 2017 году на фоне массовой вакцинации против ротавирусной инфекции, показал, что средняя доля РВА с генотипом G2P[4] составила 39 %, а в отдельных регионах страны доходила до 99 % всех типированных штаммов [Roczko-Farkas et al., 2019]. В последние годы увеличение активности циркуляции штаммов с генотипом G2P[4] отмечается по всему миру, в том числе в Швеции, Японии, Китае, Венесуэле и Бразилии [36, 38, 106, 111, 184, 209, 315, 320].

Несмотря на то, что DS-1-подобные штаммы практически всегда представлены в типовой структуре РВА, на территории России их вклад обычно составляет 2-8 % [26, 206]. В нашей работе было показано, что на территории Нижнего Новгорода в период 2017-18 гг. доля штаммов с генотипом G2P[4] увеличилась до 22,9 %, а в следующий сезон составила 39,1 %.

В период 2018-19 гг. было выявлено 100 образцов с «коротким» профилем сегментов РНК в ПААГ и генотипом G2P[4], установленным в ходе

мультиплексной ПЦР. Было выявлено пять ЭФ-типов РНК ротавирусов, циркулировавших в 2018-19 гг. (Рисунок 4).

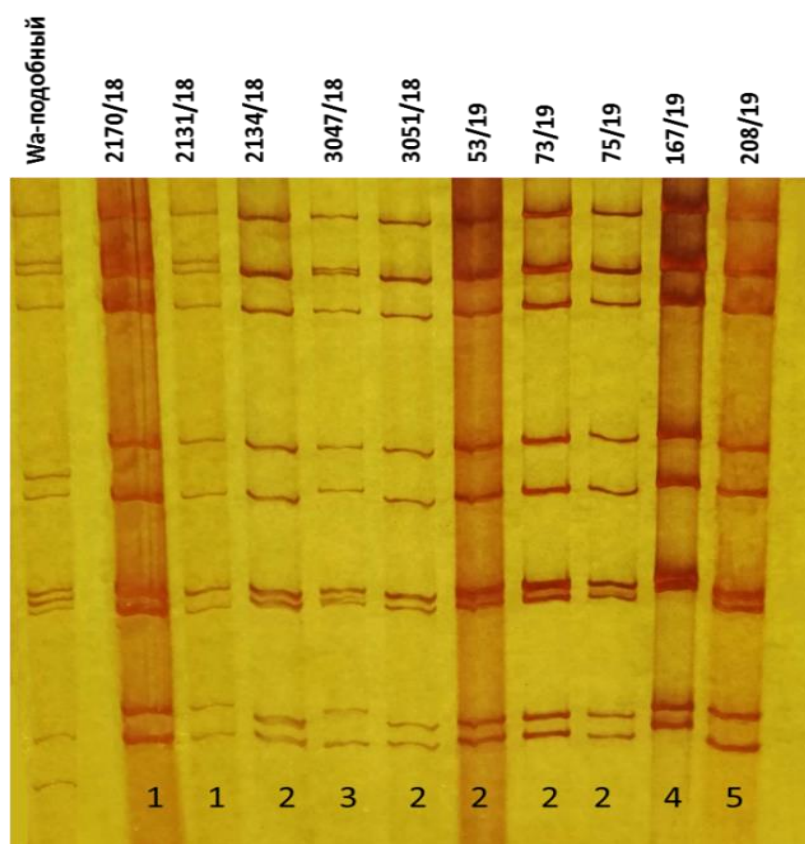


Рисунок 4. Профили миграции геномных сегментов днРНК ротавирусов, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг. 1 - 5 – варианты ЭФ-типов РНК; В крайней левой лунке - Wa-подобный вариант представлен генотипом G9P[8]

Для филогенетического анализа ротавирусов с генотипом G2P[4] по генам VP7 и VP4 были секвенированы десять образцов РВА, профили миграции РНК которых представлены на рисунке 4. С помощью on-line инструмента BLAST в выборку были добавлены последовательности ротавирусов, доступных в международной базе GenBank и максимально гомологичные исследуемым. Кроме этого, в анализ были взяты нуклеотидные последовательности с генотипом G2P[4] штаммов, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2016-2018 гг.

В настоящее время принято выделять следующие аллели генотипа G2: I, II, III и IV; при этом четвертую линию подразделяют на три сублинии (IVa-1- IVa-3) [135]. Изоляты с генотипом G2P[4], выделенные на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг., несли аллели G2-IVa-1 и G2-IVa-3 гена VP7. Сублиния G2-IVa-3 на филогенетическом дереве разделилась на два достоверных подкластера (a-3-a и a-3-b) с уровнем апостериорной вероятности узлов равной 1 (Рисунок 5). Оба подкластера включали нижегородские штаммы, выявленные в 2018-19 гг., а также РВА циркулировавшие на территории Нижнего Новгорода ранее (2016-18 гг.). Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей внутри подкластеров a-3-a и a-3-b составил более 99 %, гомология между подкластерами была в пределах 96-97 %. Аллель G2-IVa-1 обнаружен у одного нижегородского штамма, изолированного в 2019 году, который был филогенетически близок ротавирусам, выявленным в 2016-2018 гг., в период низкой активности циркуляции РВА с генотипом G2P[4]. Уровень гомологии между аллелью IVa-1 и аллелью IVa-3 варьировал в пределах 95-96 %.

У РВА с генотипом P[4] гена VP4 принято выделять четыре аллеля: P[4]-I, P[4]-II, P[4]-III, P[4]-IV, при этом четвертая линия делится на две сублинии (P[4]-IVa и P[4]-IVb) [135]. На территории Нижнего Новгорода были выделены ротавирусы, принадлежащие сублиниям P[4]-IVa и P[4]-IVb.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена VP4 G2P[4] РВА, выявленных в период активной циркуляции в 2018-19 гг., позволил установить, что нижегородские ротавирусы несли аллели P[4]-IVa и P[4]-IVb (Рисунок 6). Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей составил 97-98 % внутри кластеров IVa и IVb и 96 % между ними.

По гену VP7 и по гену VP4 нижегородские штаммы G2P[4], изолированные в 2018-19 гг., кластеризовались с ротавирусами, выделенными в 2011-16 гг. в Сингапуре, Японии, Турции, Индии и странах Европы, а на территории России – в Новосибирске и Омске. Кроме этого, в описанные кластеры входят РВА, изолированные на территории Нижнего Новгорода в 2016-18 гг.

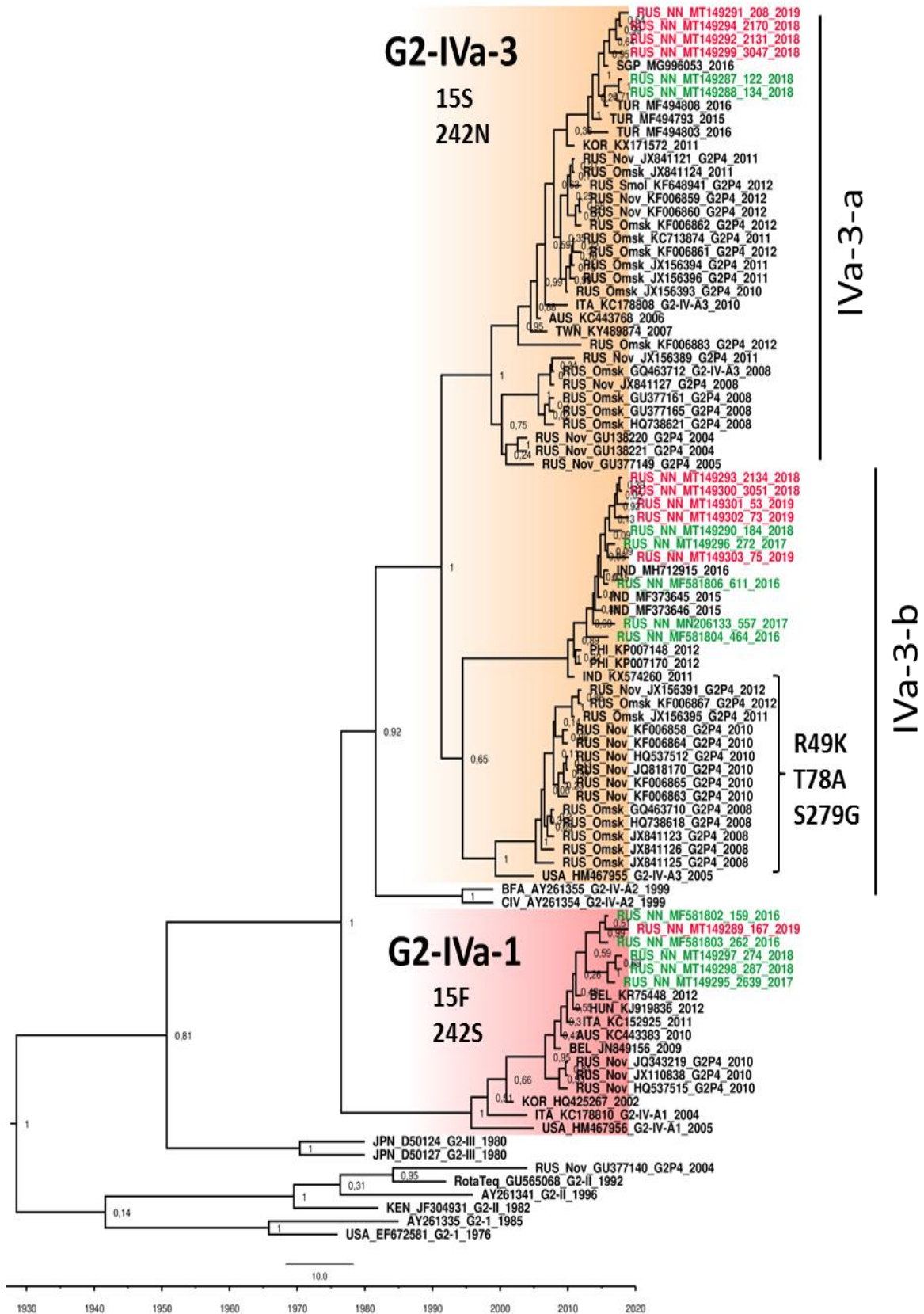


Рисунок 5. Филогенетическое дерево, сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 с генотипом G2 РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг.

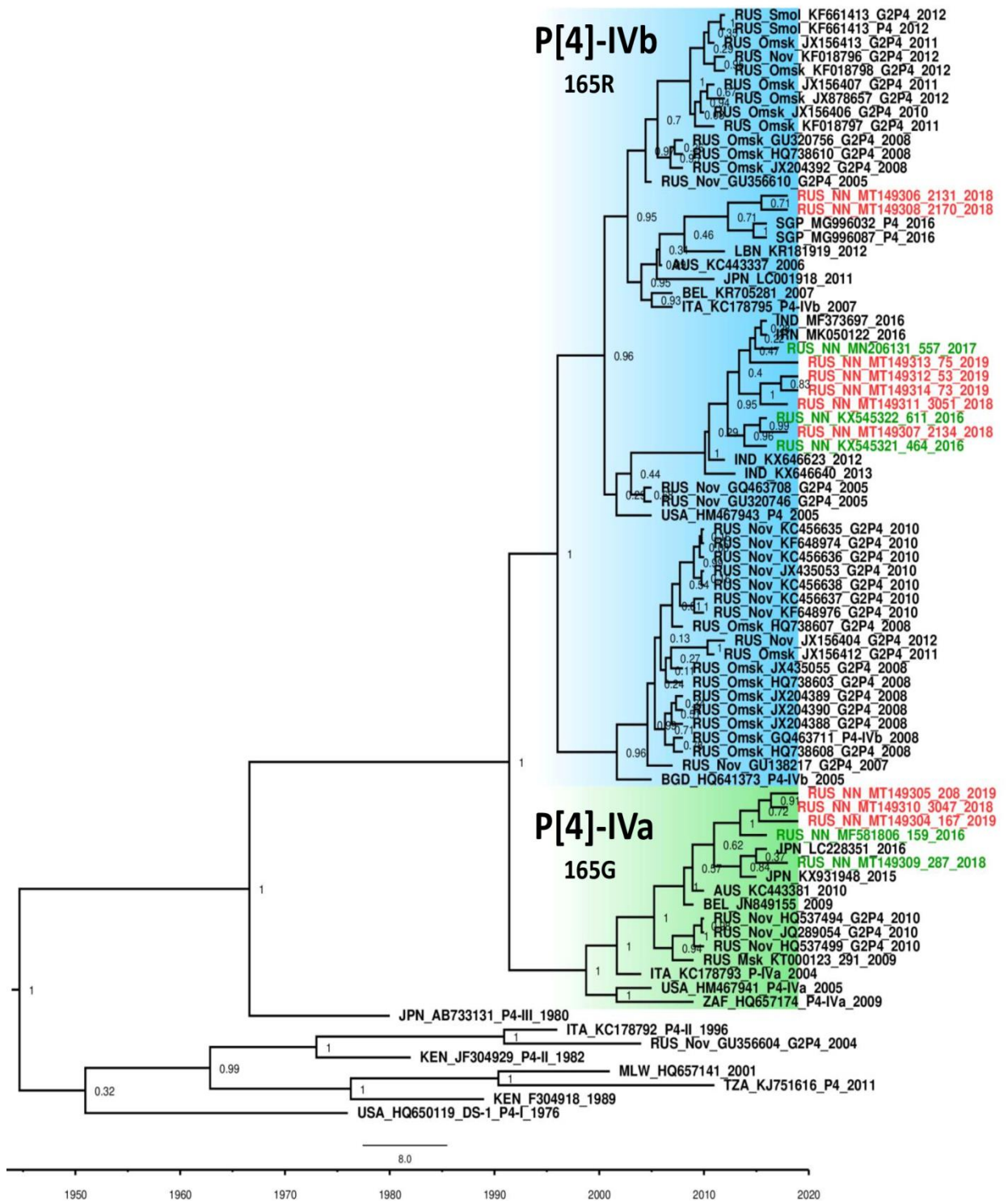


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP4 с генотипом P[4] РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг.

В ходе филогенетического анализа показано, что G2P[4] ротавирусы, изолированные в Нижнем Новгороде в 2018-19 гг. в период активизации их циркуляции, несут два аллеля гена VP7 (G2-IVa-1 и G2-IVa-3) и два аллеля гена VP4 (P[4]-IVa и P[4]-IVb), которые были обнаружены в трех комбинациях (Таблица 8).

Таблица 8. Штаммы с генотипом G2P[4], изолированные на территории Нижнего Новгорода в 2018-19 гг.

№ п/п	ЭФ-тип	№ пробы	VP7 аллель	VP4 аллель
1.	1	2170/18	G2-IVa-3a	P4-IV-a
2.	1	2131/18	G2-IVa-3a	P4-IV-a
3.	2	2134/18	G2-IVa-3b	P4-IV-b
4.	3	3047/18	G2-IVa-3a	P4-IV-a
5.	2	3051/18	G2-IVa-3b	P4-IV-b
6.	2	53/19	G2-IVa-3b	P4-IV-b
7.	2	73/19	G2-IVa-3b	P4-IV-b
8.	2	75/19	G2-IVa-3b	P4-IV-b
9.	4	167/19	G2-IVa-1	P4-IV-a
10.	5	208/19	G2-IVa-3a	P4-IV-a

Таким образом, в ходе изучения ротавирусов с генотипом G2P[4], изолированных в Нижнем Новгороде в период активизации их циркуляции (2018-19 гг., частота обнаружения 39,1 %), была установлена их принадлежность к двум линиям по гену VP7 и двум линиям по гену VP4. Линии, которым принадлежат нижегородские изоляты, убиквитарны и встречаются по всему миру, в том числе и в России. Родство изучаемых штаммов 2018-19 гг. с PVA, изолированными на территории Нижнего Новгорода ранее, позволяет говорить о возможных естественных причинах роста доли штаммов с генотипом G2P[4] в типовой структуре ротавируса.

1.3 Выявление и характеристика Wa- и DS-1-подобных реассортантов ротавируса

Ранее, в 2013-14 гг. в рамках данной работы была установлена циркуляция штаммов с генотипом G1P[8] и коротким профилем РНК-ПААГ. В указанный период в 48 образцах (15,5 %) были идентифицированы РВА генотипа G1P[8]. Следует отметить, что РВА генотипа G1P[8] являются типичными Wa-подобными штаммами с «длинным» электрофоретическим профилем РНК. Среди выявленных РВА генотипа G1P[8] в 40 случаях наблюдался «длинный» Wa-подобный профиль РНК, у 8 изолятов – «короткий», характерный для DS-1-подобных штаммов. На рисунке 7 представлен полиакриламидный гель, отображающий профили миграции сегментов РНК анализируемых штаммов ротавирусов.

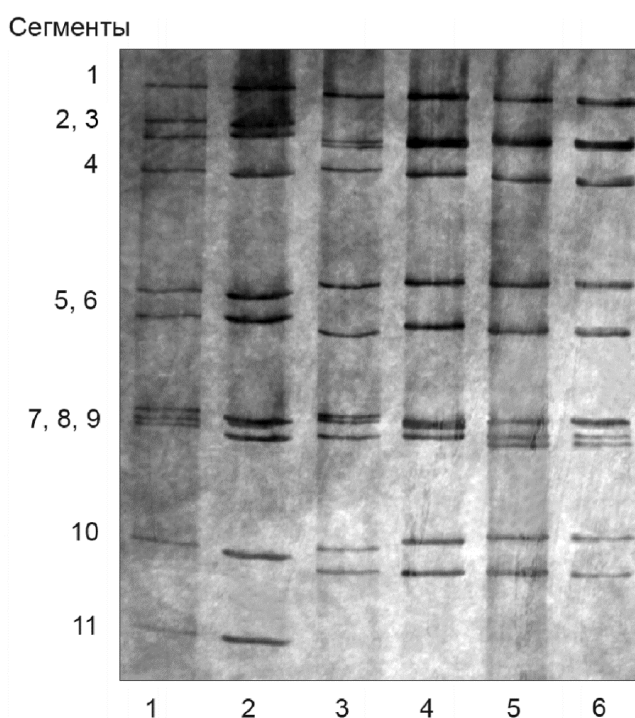


Рисунок 7. Профили миграции геномных сегментов днРНК РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода в сезон 2013-2014 гг. Образцы 1 и 2 – типичные Wa-подобные штаммы G4P[8] и G1P[8] генотипов, соответственно. Образцы 3 и 4 – типичные G2P[4] DS-1-подобные штаммы. Под номерами 5 и 6 представлены G1P[8] DS-1-подобные реассортантные штаммы, идентифицированные в данной работе.

Четыре клинических изолята РВА G1P[8] с «коротким» электрофоретическим РНК были секвенированы по четырем генам (VP7, VP4, VP6 и NSP4). Генотиповой анализ показал их принадлежность к генотипу G1-P[8]-I2-E2. Наличие в составе генома последовательностей РВА двух геногрупп свидетельствует о реассортантном происхождении обнаруженных штаммов, которые являются двойными межгеногрупповыми реассортантами.

На основе частичных нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 реассортантных ротавирусов вида А построены Байесовы МСС⁵филогенетические деревья (Рисунок 8).

По гену VP7 три из проанализированных образцов с генотипом G1-P[8]-I2-E2 несли аллель G1-1, а один принадлежал линии G1-2 DS-1-подобным ротавирусам генотипа G1P[8]. Реассортанты, изолированные на территории Японии, принадлежат линии G1-1, тогда как РВА, изолированные на территории Таиланда, несут аллель G1-2.

По гену VP4 все реассортантные G1P[8] штаммы РВА, изолированные на территории Нижнего Новгорода, принадлежат линии P[8]-3, аналогично с реассортантными штаммами, изолированными в Японии, Таиланде и Австралии.

По гену VP6, нуклеотидные последовательности нижегородских образцов кластеризовались в группу с реассортантными РВА, изолированными в других странах (Таиланд, Япония и Австралия).

По гену NSP4 российские, тайские и японские штаммы РВА с генотипом G1P[8] кластеризовались отдельно от G3P[8] DS-1-подобных ротавирусов, которые были обнаружены в Австралии и Таиланде.

В нашем исследовании в популяции ротавирусов показано наличие реассортантных вариантов G1P[8] с DS-1-подобным профилем РНК-ПААГ на фоне снижения циркуляции типичных G1P[8] РВА.

⁵ МСС (Maximum clade credibility) tree – дерево с наибольшей надежностью топологии кладов

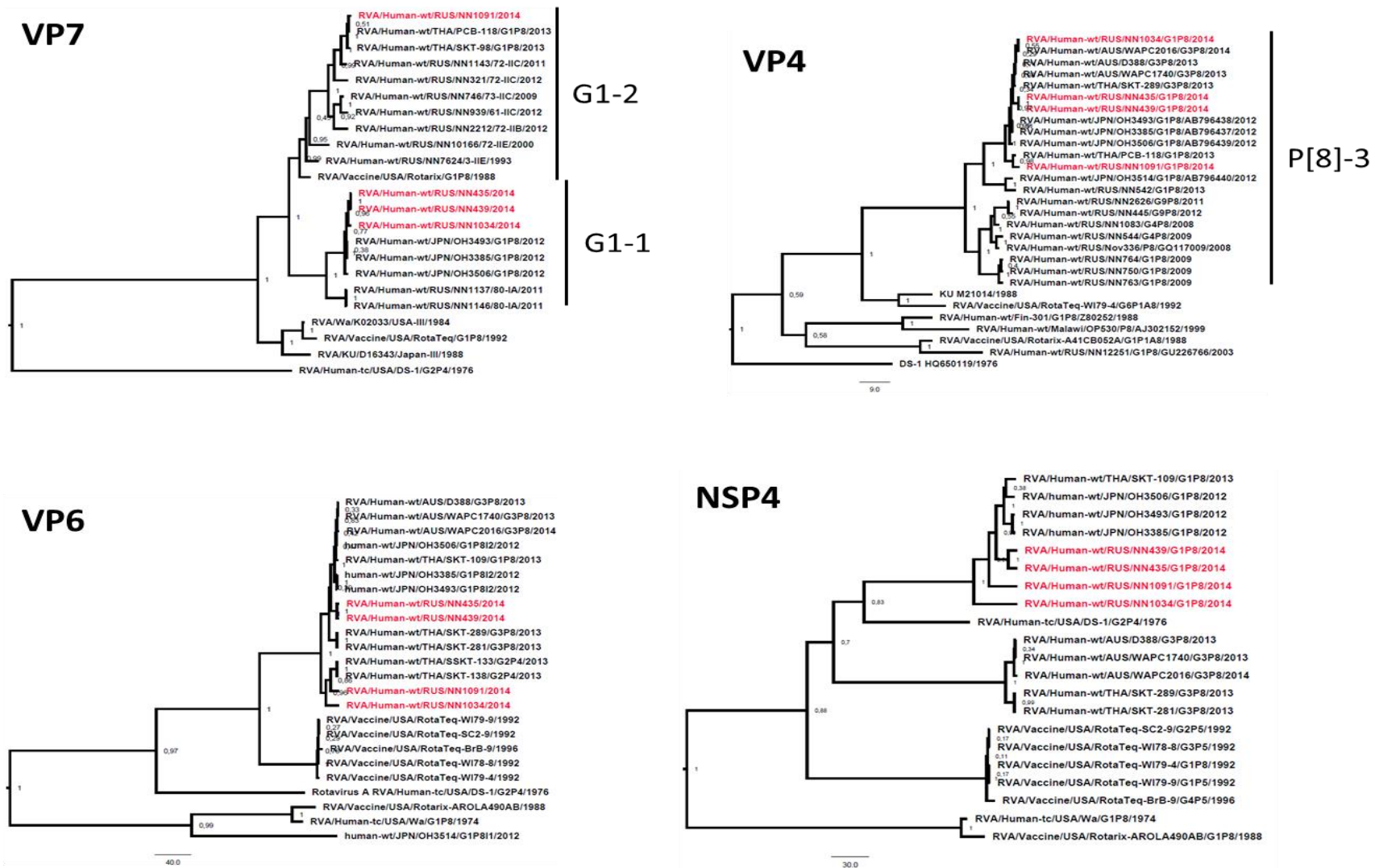


Рисунок 8. Байесовы MCC филогенетические деревья, построенные на основе частичных нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 реассортантных ротавирусов вида А

Доля реассортантов между Wa- и DS-1-подобными штаммами на территории Нижнего Новгорода в 2013-14 гг. составила 2,6 %. Тогда как в Таиланде «короткие» G1P[8] штаммы также встречались в единичных вариантах. Однако на территории Японии подобные варианты широко распространились и в сезон 2012-2013 преобладали в популяции РВА (46,7 %), а также являлись доминирующими при вспышечной заболеваемости ротавирусным гастроэнтеритом в ряде регионов [330]. В Австралии в 2013 году реассортантный штамм G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 стал доминирующим среди детей с тяжелым течением РВИ [91]. Исследования реассортантных штаммов, подтверждают динамичный характер ротавирусной популяции и иллюстрируют потенциал для возникновения новых геновариантов РВА, способных к быстрому распространению. Возможно, межгрупповая реассортация дает РВА возможность преодолеть иммунологический прессинг и сохранить G1P[8] генотип в мировой популяции ротавируса, поскольку G1P[8] штаммы, обладающие DS-1-подобными белками, могут обладать селективным преимуществом.

Поиск межгеногрупповых реассортантов был продолжен, и в 2015-16 гг. были выявлены AU-1-подобные штаммы G3P[9] и G6P[9], которые несут в составе ген VP6 I2 и NSP4 ген E3 генотипа, т.е. также являются реассортантами между AU-1- и DS-1-подобными РВА. В период 2016-20 гг. методами РНК-ПААГ и мультиплексного ПЦР-типирования в нижегородской популяции ротавирусов идентифицированы и другие межгрупповые реассортанты. Следует отметить, что увеличение доли реассортантов между первой и второй геногруппами и их разнообразие коррелировало с активизацией циркуляции ротавирусов с генотипом G2P[4]. В эпидемический сезон 2016-17 гг. выявлено четыре изолята с генотипом G9P[4] и коротким профилем РНК в ПААГ (Таблица 9). В 2017-18 гг. выявлено пять вариантов реассортантных штаммов, что составило 5,4 % от типированных штаммов нижегородских РВА. В следующий сезон доля реассортантных вариантов начала расти и составила 10,9 %, а в сезон 2019-20 гг. их доля выросла до 12,7 %.

Наиболее часто встречающиеся РВА человека являются представителями Wa-подобной («длинный» электрофоретип РНК) и DS-1-подобной («короткий» электрофоретип РНК) геногрупп.

Таблица 9. Межгрупповые реассортанты, выявленные в Нижнем Новгороде в 2016-20 гг.

Сезон	Типированные РВА абс (n)	Реассортантные штаммы		Установленные генотипы
		абс (n)	%	
2016-17	376	4	1,1	G9P[4]к*
2017-18	279	15	5,4	G9P[8]к, G3P[8]к, GxP[8]к, G1P[x]к, G2P[x]к
2018-19	256	28	10,9	G2P[8]к, G4P[4]к, G1P[8]к, G4P[8]к, G9P[8]к, GxP[8]к, G9P[x]к
2019-20	300	38	12,7	G1P[8]к, G9P[8]к, G3P[8]к, G3P[4]к, G9P[4], G2P[8]к

*к – обозначение варианта с коротким профилем РНК в ПААГ.

Для прототипных штаммов этих геногрупп определены генотипы всех 11 сегментов днРНК: GX-P[X]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 для Wa-подобных штаммов и G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 для DS-1-подобных штаммов [226]. AU-1-подобные штаммы относятся к третьей геногруппе и получили значительно меньшее распространение: G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3. Межгрупповые реассортанты РВА обнаруживаются сравнительно редко, считается, что такие варианты менее конкурентоспособны [229]. Однако в 2011-2013 годах реассортанты Wa- и DS-1-подобных штаммов были обнаружены в Японии, Таиланде и Австралии [91, 189, 194, 330]. В Японии была показана циркуляция G1P[8] DS-1-подобных РВА. В Австралии были обнаружены G3P[8] РВА в сочетании с остальными генами, относящимися ко второй геногруппе. В Таиланде циркулировали как G1P[8], так и G3P[8] реассортанты.

В последние годы выполнено большое количество исследований, посвященных анализу ротавирусной популяции на основе полного генома. Эти

исследования позволили установить уникальное генетическое разнообразие РВА, а также важную роль процесса реассортации в формировании нового фенотипа. Ранее предполагалось, что межгрупповые реассортанты менее жизнеспособны [229]. На культуре клеток реассортантные штаммы (между Wa- и DS-1 геногруппами) проигрывали родительским вариантам при нескольких перевиваниях на культуре клеток [321]. Однако после 2008 года в международной базе данных статей PubMed резко возросло количество сообщений, посвященных межгеногрупповым реассортантам. Всего на тему межгеногрупповых реассортантов между первой и второй геногруппой с 1982 по 2020 год опубликовано 58 работ. При этом 47 из них опубликовано после 2008 года. Это может свидетельствовать о более детальном изучении циркулирующих штаммов с использованием современных подходов к анализу генома.

Таким образом, на примере нижегородской популяции ротавируса впервые установлена циркуляция на территории России межгрупповых реассортантных штаммов. В сезон 2018-19 гг., когда была отмечена активизация циркуляции штаммов с генотипом G2P[4], доля межгеногрупповых реассортантов в типовой структуре РВА составила 10,9 % и увеличилась до 12,7 % в сезон 2019-20 гг.

1.4 Филогенетическая характеристика штаммов ротавируса с генотипами G4P[8] и G2P[4] на основе полного генома

До недавнего времени классификация ротавирусов базировалась на молекулярных свойствах белков наружного капсида VP7 и VP4. Поскольку реассортация играет ключевую роль в формировании разнообразия популяции РВА, классификация, основанная на определении генотипа всех сегментов генома необходима для изучения эпидемиологии и эволюции ротавирусов [223]. Подавляющее большинство РВА, инфицирующих человека, относятся к первой (Wa-подобные) и второй (DS-1-подобные) геногруппам. Согласно полногеномной

классификации, констелляцию генов первой геногруппы схематично можно описать как Gx-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, а второй геногруппы как G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 [222]. К настоящему времени ряд исследований посвящен анализу полного генома штаммов РВА, изолированных от человека и животных [48, 132, 222, 242, 302]. Однако полногеномная характеристика штаммов ротавирусов, циркулирующих на территории России, не представлена в литературе.

Ротавирус с генотипом G4P[8] является одним из преобладающих, генетически стабильным эпидемическим вариантом на территории России [2, 6, 206, 340]. В Нижнем Новгороде РВА с генотипом G4P[8] доминировали в период 2005-2015 гг. Неотъемая часть типовой структуры ротавируса – штаммы с генотипом G2P[4]. В 1985-86 гг. в Н. Новгороде был отмечен рост количества ротавирусов с коротким профилем миграции сегментов РНК в ПААГ [16]. Следующий период активизации циркуляции DS-1-подобных штаммов с генотипом G2P[4] был отмечен только в 2018-19 гг.

В совместной работе с сотрудниками лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов Алексеевой А.Е. и Бруснигиной Н.Ф., были получены последовательности полного генома российских штаммов ротавируса А с генотипами G2P[4] и G4P[8].

В ходе типирования полученных нуклеотидных последовательностей генов, с использованием он-лайн инструмента RotaC было установлено, что изученные штаммы несут констелляции генов: G4-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-T1 и G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-T2, соответственно. Таким образом, изученные штаммы несут типичные для Wa-подобных (G4P[8]) и для DS-1-подобных (G2P[4]) штаммов РВА констелляции генов.

В настоящее время опубликованы несколько научных работ, посвященных классификации линий и сублиний для генов РВА. Чаще всего аллели выделяют для генов VP4 и VP7. Мы использовали классификацию Doan и др. и Giammanco и др. для идентификации линий штамма G2P[4] [108, 109, 135]. Для определения аллелей нижегородского штамма G4P[8], была использована классификация Bok et al. и

Pradhan et al. [64, 263]. В ходе исследования были идентифицированы констелляции аллелей генов: G4-1C/P[8]-3.6/I1-4/R1-A2/C1-A1/M1-A1/A1-B/N1-A/T1-A2/E1-1/H1-A и G2-IVa-3/P[4]-IVb/I2-VII/R2-VII/C2-VIII/M2-V/A2-II/N2-II/T2-IV/E2-XII/H2-III. Ротавирусы, несущие в своем составе установленные аллели, встречаются повсеместно.

Филогеография и филогенетика вирусов – относительно новые направления, которые позволяют получить дополнительные сведения об эволюции патогена, связать анализируемую генетическую информацию с возможным географическим происхождением штамма. Низкая инфекционная доза, высокая контагиозность и алиментарный механизм передачи ротавируса способствует его легкой трансмиссии между странами и континентами. Поскольку ротавирусы обладают сегментированным геномом, исследование было проведено на основе отдельных выборок для всех 11 сегментов штаммов G2P[4] и G4P[8].

Для филогеографического анализа были использованы доступные в GenBank полные нуклеотидные последовательности сегментов генома РВА. Выборка была составлена с помощью базы данных «Virus Variation» [151]. Количество проанализированных последовательностей для каждого сегмента приведено в таблице 10.

Таблица 10. Количество нуклеотидных последовательностей, взятых для филогеографического анализа в международной базе данных GenBank

Ген Штамм	VP7 G	VP4 P	VP6 I	VP1 R	VP2 C	VP3 M	NSP1 A	NSP2 N	NSP3 T	NSP4 E	NSP5/6 H
DS-1	598	338	1150	901	850	863	395	924	775	823	738
Wa	257	1743	2126	1576	1612	1610	1703	2022	1863	1785	2045
Всего	855	2081	3276	2477	2462	2473	2098	2946	2638	2608	2783

На первом этапе, для составления подвыборки для Байесовского анализа, были построены филогенетические деревья методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining). На основе полученного филогенетического дерева отбирали 70-

100 последовательностей, изолированных в разные годы и разных географических регионах. Полученные подвыборки были использованы для расчёта филогенетических характеристик в пакете программ BEAST.

Скорость мутаций мало отличалась между штаммами и между сегментами генома и составила $4.5E-4 - 2.8E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для штамма G4P[8] и $7.51E-4 - 1.81E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для РВА с генотипом G2P[4] (Таблица 11). Эти данные аналогичны расчетам, полученным в других исследованиях [31, 110, 132, 238, 337]. Следует отметить, что по генам VP6, VP3 и NSP2 скорость мутаций штамма G2P[4] в два раза выше, чем у штаммов G4P[8].

В нашей работе мы реконструировали пространственно-временное происхождение исследуемых образцов на основе отдельных выборок нуклеотидных последовательностей для каждого сегмента. Для того чтобы подтвердить связь между избранными локациями, с помощью программного обеспечения SPREAD был рассчитан фактор Байеса (BF) при значении которого >3 можно говорить о достоверной эпидемической связи между штаммами. Коэффициент 3-20 свидетельствует о положительной поддержке, 20-150 показывает сильную эпидемиологическую связь и >150 –преобладающую поддержку.

Таблица 11. Определение аллелей внутри генотипа и скорости накопления мутаций для каждого сегмента генома на основе Байесовской филогенетической реконструкции в пакете программ BEAST

Ген	VP7 G	VP4 P	VP6 I	VP1 R	VP2 C	VP3 M	NSP1 A	NSP2 N	NSP3 T	NSP4 E	NSP5/6 H
G4P[8] (2079/17)	G4-1C	P[8]-3.6	I1-4	R1-A2	C1-A1	M1-A1	A1-B	N1-A	T1-A2	E1-1	H1-A
Нуклеотидных замен/на сайт/в год [95%HPD]	1.92E-3 [1.08E-3 – 2.96E-3]	5.07E-4 [3.33E-4 – 6.87E-4]	7.13E-4 [5.58E-4 – 8.78E-4]	1.48E-3 [1.04E-3 – 2.06E-3]	7.80E-4 [4.91E-4 – 1.12E-3]	7.42E-4 [5.56E-4 – 9.39E-4]	2.80E-3 [1.59E-3 – 4.05E-3]	9.68E-4 [5.21E-4 – 1.44E-3]	1.21E-3 [7.25E-4 – 1.76E-3]	8.01E-4 [5.39E-4 – 1.08E-3]	4.50E-4 [2.41E-4 – 6.73E-4]
G2P[4] (557/17)	G2-IVa- 3	P[4]-IVb	I2-VII	R2-VII	C2-VIII	M2-V	A2-II	N2-II	T2-IV	E2-XII	H2-III
Нуклеотидных замен/на сайт/в год [95%HPD]	1.14E-3 [5.26E-4 – 1.89E-3]	9.74E-4 [7.16E-4 – 1.226E-3]	1.46E-3 [8.66E-4 – 1.44E-3]	8.75E-4 [6.59E-4 – 1.12E-3]	7.51E-4 [5.30E-4 – 1.02E-3]	1.09E-3 [7.99E-4 – 1.41E-3]	1.81E-3 [1.23E-3 – 2.53E-3]	1.34E-3 [9.82E-4 – 1.77E-3]	1.43E-3 [8.75E-4 – 1.43E-3]	9.66E-4 [6.70E-4 – 1.29E-3]	1.07E-3 [5.84E-4 – 1.74E-3]

В настоящем исследовании удалось установить достоверные эпидемические связи (при $BF > 3$) для всех 11 сегментов исследованных штаммов (Таблица 12, Рисунок 9).

В состав штамма с генотипом G4P[8] входят гены с широкой географией наиболее вероятного происхождения каждого гена: Россия, Китай, Таиланд, Бельгия, Венгрия, Италия, Япония. Возраст ближайшего общего предка различается в зависимости от исследуемого сегмента и варьирует в пределах 2001-2012 гг. Ближайший общий предок для штамма с генотипом G2P[4] циркулировал на территориях Индии, Малави, Бангладеш, Италии и Австралии. Возраст общего предка в зависимости от гена варьировал от 2006 до 2013 года. Филогенетические деревья, сконструированные на основе нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и штаммов, доступных в международной базе GenBank, представлены в дополнительных материалах.

Ранее, на примере последовательностей гена VP7 генотипов G1, G2, G3, G4 и G9, изолированных в Японии, был составлен прогноз скорости распространения штаммов РВА [132]. Анализ был выполнен с помощью Байесовского подхода на основе расчета возраста ближайшего общего предка (tMRCA). Было установлено, что генерация эпидемически значимых штаммов занимает 1-3 года. Для того чтобы штамм стал эпидемически значимым в пределах всей страны, требуется 2-6 лет (на примере Японии) [132]. Поскольку в описанном исследовании расчёт был выполнен на основе одного сегмента генома, можно предположить, что исследование на основе полной констелляции генов в несколько раз усложнит анализ. Так, на примере наших выборок, показано, что сегменты генома имеют полифилетическое происхождение. Ближайший общий предок, в зависимости от рассматриваемого гена, датировался 2001-2012 гг. для штамма G4P[8] и 2006-2013 гг. для штамма G2P[4]. Однако для того, чтобы говорить о формировании устойчивого варианта на основе полного генома, скорости формирования эпидемического варианта и его распространения потребуются дополнительные исследования.

Таблица 12. Апостериорная вероятность происхождения для каждого сегмента генома российских штаммов с генотипами G2P[4] и G4P[8]. Байесовский фактор (BF) и время циркуляции ближайшего общего предка (tMRCA)

Ген		G4P[8]			G2P[4]		
		Регион-источник	BF	tMRCA [95%HPD]	Регион-источник	BF	tMRCA [95%HPD]
VP7	G	Россия (Нижний Новгород)	175	2012 [2011-2014]	Индия	4	2013 [2012-2015]
VP4	P	Россия (Новосибирск)	274	2008 [2005-2009]	Индия	54	2010 [2009-2012]
VP6	I	Россия (Омск)	302	2007 [2006-2008]	Индия	222	2008 [2007-2009]
VP1	R	Китай	959	2001 [1995-2008]	Австралия	167	2006 [2004-2008]
VP2	C	Венгрия	93	2008 [2007-2010]	Малави	585	2006 [2005-2008]
VP3	M	Таиланд	115	2009 [2008-2010]	Бангладеш	81	2008 [2006-2009]
NSP1	A	Бельгия	576	2007 [2005-2008]	Индия	57	2011 [2010-2012]
NSP2	N	Венгрия	493	2010 [2008-2011]	Малави	149	2006 [2004-2008]
NSP3	T	Венгрия	315	2009 [2007-2011]	Малави	3834	2010 [2008-2011]
NSP4	E	Италия	11	2010 [2009-2012]	Индия	52	2010 [2007-2011]
NSP5	H	Япония	4	2006 [2002-2009]	Италия	15	2013 [2011-2015]

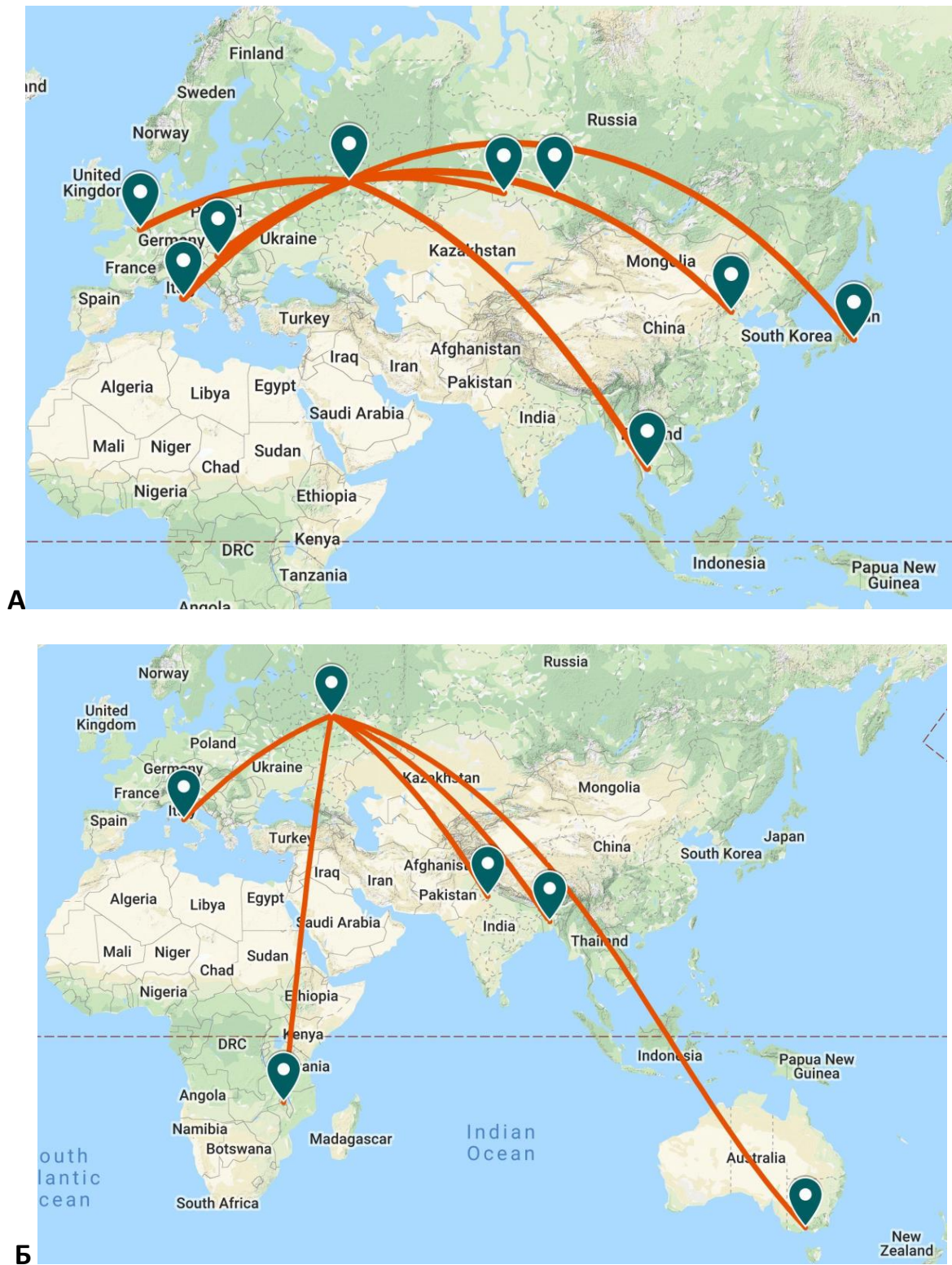


Рисунок 9. Географическая констелляция генов G4P[8] (А) и G2P[4] (Б) штаммов РВА, изолированных на территории России.

Таким образом, увеличивающаяся доступность детально аннотированных последовательностей генома предоставляет возможность исследовать эпидемиологические особенности патогена в свете эволюционной истории. В нашем исследовании Байесовский филогеографический подход был использован для установления пространственно-временных паттернов для каждого сегмента ротавирусов с генотипами G2P[4] и G4P[8], изолированных на территории России в 2017 году. В ходе анализа показана аллельная принадлежность для каждого сегмента генома изученных штаммов: G4-1C/P[8]-3.6/I1-4/R1-A2/C1-A1/M1-A1/A1-B/N1-A/T1-A2/E1-1/H1-A и G2-IV-3a/P[4]-IVb/I2-VII/R2-VII/C2-VIII/M2-V/A2-II/N2-II/T2-IV/E2-XII/H2-III. В ходе анализа была установлена скорость мутаций отдельно для каждого сегмента генома, которая составила: $4.5E-4 - 2.8E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для штамма G4P[8] и $7.51E-4 - 1.81E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для РВА с генотипом G2P[4]. Рассчитана достоверная эпидемическая связь со штаммами из других регионов, позволяющая говорить о полифилетическом происхождении сегментов генома. В ходе работы установлено, что для штамма с генотипом G4P[8] наиболее вероятные географические локации ближайшего общего предка были: Россия (VP7, VP4, VP6), Китай (VP1), Таиланд (VP3), Бельгия (NSP1), Венгрия (VP2, NSP2, NSP3), Италия (NSP4) и Япония (NSP5). Для штамма с генотипом G2P[4]: Индия (VP7, VP4, VP6, NSP1, NSP4), Малави (VP2, NSP2, NSP3), Австралия (VP1), Италия (NSP5) и Бангладеш (VP3). Ближайший общий предок штамма с генотипом G4P[8] циркулировал в 2001-2012 гг в зависимости от анализируемого гена. Для штамма с генотипом G2P[4] ближайший общий предок датируется в диапазоне 2006-2013 гг.

Активная миграция населения и высокая контагиозность способствуют глобальной экспансии ротавируса вида А. Прогнозирование развития эпидемического процесса сильно осложнено возможным вакцинным давлением, а также естественной флуктуацией генотипового разнообразия РВА. Филогеографический подход к изучению и распространению ротавирусной инфекции может способствовать выявлению географических областей, где локализуются пулы будущих эпидемических вариантов и в целом понять динамику

трансмиссии РВА. По всей видимости, гетерогенность региональных популяций ротавируса будет нарастать в дальнейшем, создавая условия для генерации новых реассортантных форм патогена. Полученные данные необходимо принимать во внимание при оценке вакцинного прессинга на популяцию РВА.

2 Филогенетические взаимоотношения вакцинных штаммов и ротавирусов глобальных генотипов, циркулирующих на территории России

Ротавирусная популяция отличается сложностью генотиповой и антигенной структурой. Ряд исследований показывает, что штаммы РВА, несущие разные аллели генов, могут обладать разными антигенными свойствами, тем самым потенциально позволяя вирусу избегать иммунного ответа [42, 50, 51, 163, 176]. Поскольку вакцинные штаммы Rotarix® и RotaTeq® были изолированы более 30 лет назад, аллели генов современных РВА могут отличаться от вакцинных. В связи с этим, научно-практический интерес представлял филогенетический анализ вакцинных и диких штаммов ротавируса на основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих протективные антигены.

Рядом авторов предложено выделение линий внутри наиболее распространенных генотипов VP7, VP4, VP6 и NSP4, однако к настоящему времени устоявшейся классификации аллелей не существует. Обычно выделение линий базируется на основе кластеризации достоверных паттернов при анализе дендрограммы, сконструированной на основе нуклеотидных последовательностей. Филогенетическое дерево строят с использованием методов максимального правдоподобия или объединения ближайших соседей и выделяют аллели, если поддержка бутстрапа будет в рамках 70-100 %. При этом, уровень нуклеотидных различий не является ориентиром и может варьировать между аллелями внутри одного генотипа. В нашей работе мы придерживались разделению рассмотренных

генотипов на линии, предложенному в той или иной работе, ссылки, на которые приведены в соответствующем разделе.

2.1 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена белка наружного капсида VP7

Ген VP7 размером 1062 п.н. кодирует гликопротеин (G- glycoprotein) наружного капсида вириона. В настоящее время на основе нуклеотидной последовательности гена VP7 выделено 36 G-типов ротавируса вида А, которые были изолированы у человека и животных. При этом глобальными, т.е. наиболее распространенными в человеческой популяции, являются шесть генотипов: G1, G2, G3, G4, G9 и G12. G-генотипы выделяют, когда уровень различий нуклеотидной последовательности превысит 20 %. Как было сказано выше, пентавалентная вакцина RotaTeq® включает в себя штаммы с генотипами G1, G2, G3 и G4 гена VP7. Моновалентная вакцина Rotarix® включает штамм с генотипом G1 гена VP7. Для сравнительного филогенетического анализа современных дикого типа и вакцинных штаммов РВА были проанализированы 124 последовательности гена VP7 ротавирусов, изолированных в Нижнем Новгороде. Перечень штаммов приведен в приложении (Таблица А1). Кроме этого, в анализ взята выборка 346 последовательностей российских РВА, доступных в базе данных GenBank.

G1. В представленной работе для генотипа G1 мы придерживались разделения линий, предложенного Phan с соавторами [259]. Согласно этой классификации достоверно можно выделить 11 линий, 9 из которых встречаются у человека. G1-компонент вакцины RotaTeq® так же, как и референтный штамм Wa, принадлежит линии G1-3. Вакцинный штамм RIX4414 в составе вакцины Rotarix® несет аллель G1-2a. Нижегородские РВА генотипа G1 несут аллели гена VP7 G1-1 и G1-2c (Рисунок 10). Ротавирусы с генотипом G1, изолированные на территории России

(Омск, Нижний Новгород, Новосибирск, Москва), также относятся к линиям G1-1 и G1-2с.

G2. Внутри генотипа G2 Giammanco G.M. с соавторами выделили 4 филогенетические линии: G2-I – G2-IV, при этом линию G2-IV делят еще на 3 сублинии (G2-IVa-1 – G2-IVa-3) [135]. Референтный штамм DS-1 и вакцинный штамм RotaTeq® SC2 (G2) несут гены VP7 линии I и II, соответственно. Нижегородские ротавирусы с генотипом G2 несут два аллеля: G2-IVa-1 и G2-IVa-3. Другие российские изоляты, выделенные в период 2008-19 гг., принадлежат линиям G2-IVa-1 и G2-IVa-3. К этим двум вариантам РВА относятся большинство G2 изолятов, выделенных по всему миру [32, 111, 263, 304, 328]. Интересно отметить, что одна идентифицированная последовательность РВА, изолированного от ребенка в 2004 году в Новосибирске, являлась аллелью G2-II, так же, как штамм в составе вакцины RotaTeq®.

G3. Wang Y.H. и соавторы выделяют три линии внутри генотипа G3: G3-1 – G3-3, третью линию дополнительно подразделяют на пять сублиний (G3-3a – G3-3e) [319]. Варианты РВА с генотипом G3 на территории Нижнего Новгорода встречались в комбинации с генотипами P[8] и P[9]. Большинство современных штаммов G3 генотипа, идентифицированных у людей, относится к линии G3-3. Штамм G3 в составе вакцины RotaTeq® (WI78-9) несет аллель G3-3d. Нижегородские образцы G3P[9] имеют аллель G3-3e, так же, как и штаммы G3P[9], изолированные ранее в Китае и Таиланде. Нижегородские штаммы G3P[8] несут аллель G3-3a. Российские штаммы с генотипом G3, доступные в базе данных GenBank, изолированные в период 2010-2018 гг. на территориях Новосибирска, Омска, Красноярска, Москвы, Владивостока, так же как и нижегородские штаммы, относятся к линиям G3-3a и G3-3e.

В 2017-20 гг. нами были изолированы штаммы с генотипом G3P[8], с аллелью G3-1. Ротавирусы этой линии, как правило, распространены среди животных [319].

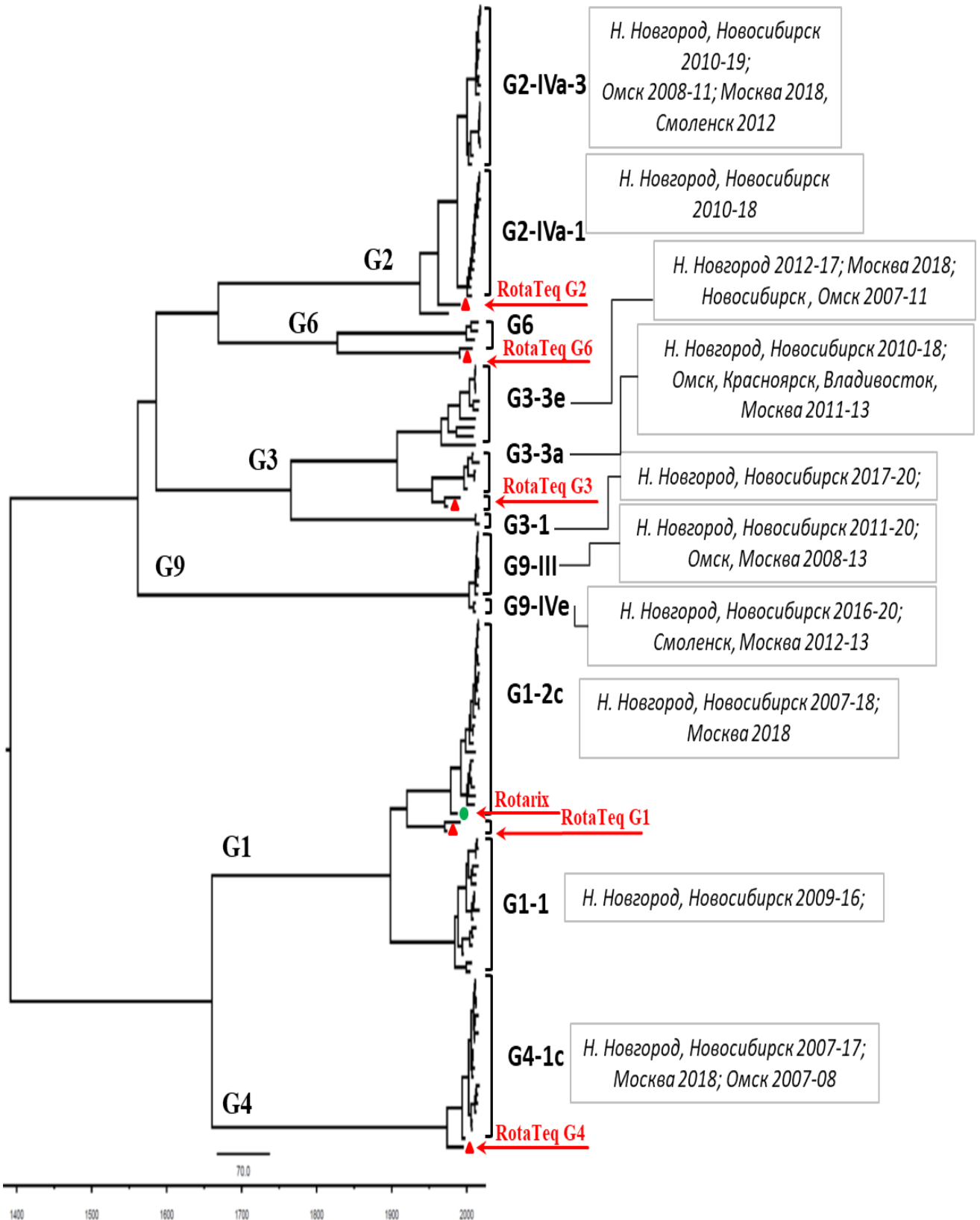


Рисунок 10. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 генотипов G1, G2, G3, G4, G6 и G9 российских РВА и вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix®.

G4. Еще одним глобальным генотипом VP7, входящим в пентавалентную вакцину RotaTeq®, является G4. Вок с соавторами, предложили деление генотипа G4 на две линии (G4-1 и G4-2), подразделив первую линию на четыре сублинии (G4-1a – G4-1e) [64]. Вакцинный штамм (BrB) с генотипом G4 несет аллель G4-1a. Нижегородские РВА с генотипом G4 имеют высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей. Изолированные нами G4 штаммы относятся к сублинии G4-1c. Стоит отметить, что период доминирования (доля в структуре вирусной популяции составляет более 30 %) штаммов ротавирусов с генотипом G4P[8] в Нижнем Новгороде составил 11 сезонов [23]. На территории Западной Сибири (Новосибирск и Омск, 2007-12 гг.) были изолированы ротавирусы, относящиеся к линии G4-2.

G9. В последнее десятилетие генотип G9 стал пятым широко распространённым генотипом среди людей, инфицированных РВА. Для РВА G9 генотипа установлено существование шести филогенетических линий [260]. Ротавирусы с генотипом G9 не включены в вакцины RotaTeq® и Rotarix®. Штамм в составе вакцины Rotavac (применяемой в Индии), несет аллель G9-II. Линия G9-III, к которой относятся и нижегородские ротавирусы, включает подавляющее большинство современных штаммов, выявленных у людей. РВА линии G9-III были выявлены в комбинациях: G9P[4], G9P[6] и G9P[8] [225]. В Нижнем Новгороде ротавирусы G9 генотипа доминировали в период 2014-2016 гг. [23] и в дальнейшем преобладали до 2018 года. Нуклеотидные последовательности гена VP7 ротавирусов, изолированных на территории России (Москва, Новосибирск, Омск), также принадлежат линии G9-III. Помимо РВА, относящихся к третьей линии, на территории нашей страны циркулируют штаммы, несущие аллель G9-IVe, которые были изолированы в Смоленске и Москве в 2012-13 гг., а также в Новосибирске и Нижнем Новгороде в 2016-20 гг.

G6. Отдельно стоит сказать про генотип G6, который был обнаружен на территории Нижнего Новгорода в 2015 и в 2016 годах. Других ротавирусов с генотипом G6, выявленных на территории России, в международной базе GenBank не представлено. Для РВА G6 генотипа установлено существование шести

филогенетических линий [46, 74, 234]. В составе вакцины RotaTeq® присутствует штамм WC3 с генотипом G6P[8]. Штаммы РВА с генотипом G6 не характерны для человека и чаще встречаются у крупного рогатого скота в сочетании с P[1], P[5] и P[11] [Badaracco et al., 2013; Cashman et al., 2010; Monini et al., 2008]. РВА с генотипом G6, изолированные от детей в Нижнем Новгороде несут аллель G6-I, в отличие от вакцинного штамма WC3 в составе RotaTeq®, принадлежащего линии G6-IV.

В ноябре 2016 года у ребенка с симптоматической РВИ был обнаружен РВА генотипа G12P[8]. Для генотипа G12 показано существование 4-х филогенетических линий [269]. На филогенетическом дереве нижегородский изолят РВА относится к линии G12-III, наиболее распространенной в настоящее время в мире, и формирует отдельный достоверный кластер с ротавирусами из Таиланда и Пакистана, идентифицированными в 2010-2012 гг.

Таким образом, российские РВА несут 12 аллелей гена VP7 восьми генотипов: G1-1 и G1-2c; G2-IVa-1 и G2-IVa-3; G3-3a, G3-3e и G3-1; G4-1c; G9-III, G9-IVe; G12-3; G6-I; G8, что отличает их от вакцинных аллелей гена VP7: G1-2a (Rotarix®), G1-3, G2-II, G3-3d, G4-1a, G6-IV (RotaTeq®). Разнообразие аллелей гена VP7 и их отличие от вакцинных не исключает возможность формирования новых антигенных вариантов ротавируса.

2.2 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена белка наружного капсида VP4

Ген VP4 размером 2362 п.н. кодирует протеазочувствительный ([P]-генотип) белок наружного капсида вириона. В настоящее время выделен 51 [P]-тип гена VP4 ротавируса вида А, изолированного у человека и животных. У РВА человека наиболее распространенными являются генотипы P[8], P[4] и P[6] [65, 158, 202]. Генотипы гена VP4 отличают друг от друга при превышении уровня различий нуклеотидных последовательностей в 20 %. Ген VP4 кодирует два белковых

домена: VP8* и VP5*. Участок VP5* является консервативным регионом, поэтому для филогенетического анализа диких штаммов используют нуклеотидную последовательность варибельного участка VP8* [185].

Согласно классификации, предложенной Arista с соавторами в 2006 году и Cunliffe с соавторами в 2001 году, на основе участка VP8* гена VP4 принято выделять 4 линии генотипа P[8] (P[8]-1 – P[8]-4) [42, 94]. В состав вакцины Rotarix® входит штамм ротавируса, несущий вариант P[8]-1. В вакцине RotaTeq® содержится ротавирус линии P[8]-2 [335].

В данной работе проанализированы нуклеотидные последовательности гена VP4, которые принадлежат ротавирусам, выделенным на территории Нижнего Новгорода в период с 2008 по 2020 годы (Рисунок 11). В выборку вошли 48 последовательностей, которые относились к генотипам P[8] (29 последовательностей) и P[4] (19 последовательностей). Перечень штаммов приведен в приложении (Таблица А2). Кроме этого, в выборку вошли 480 последовательностей гена VP4 российских ротавирусов, доступных в международной базе GenBank.

P[8]. До 2004 года, на территории России активно циркулировали ротавирусы линии P[8]-1, после чего РВА этого аллеля выявлены не были. К настоящему времени, основываясь на наших исследованиях и литературных данных, линия P[8]-2 не была обнаружена как в Нижнем Новгороде, так и в других регионах России [244]. Все современные ротавирусы P[8]-генотипа, изолированные на территории Нижнего Новгорода, принадлежат линии P[8]-3. Согласно классификации, предложенной da Silva с соавторами, подразделившими линию P[8]-3 на шесть сублиний [95], современные нижегородские штаммы несут аллели P[8]-3.1 и P[8]-3.6 (Рисунок 11).

Линия P[8]-4 до настоящего времени не идентифицирована на территории Нижнего Новгорода. Однако по литературным данным, этот вариант гена VP4 обнаруживался на территории Новосибирска в 2007-2011 гг. в комбинации с разными генотипами (G9, G4, G2, G1) гена VP7 [336]. На территории Европейской части России аллель P[8]-4 до настоящего времени не был обнаружен.

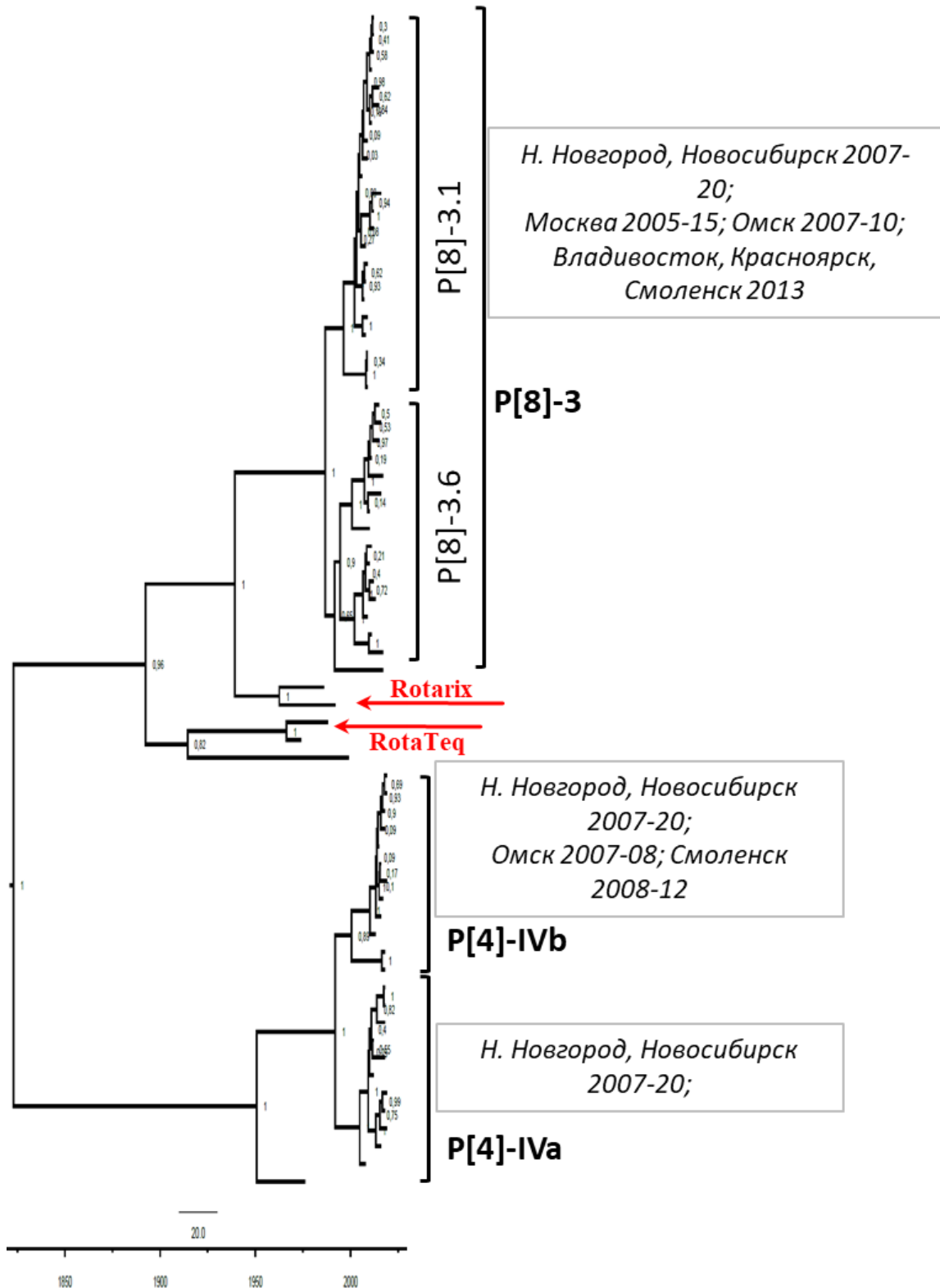


Рисунок 11. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена VP4 (домен VP8*) генотипов P[4] и P[8] РВА российских и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq®.

P[4]. В вакцину RotaTeq® входит компонент VP7 штамма SC2 с генотипом G2. Однако VP4 с генотипом P[4] не представлен в вакцинах Rotarix® и RotaTeq®, что, теоретически, может ослабить нейтрализацию вирусной частицы антителами.

В настоящее время предложена классификация, позволяющая выделить четыре варианта внутри генотипа P[4] [135]. Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей РВА, изолированных в Нижнем Новгороде, показал, что «дикие» штаммы с генотипом P[4] несут два аллеля: P[4]-IVa и P[4]-IVb.

Третьим наиболее распространенным генотипом VP4 в мире является P[6]. РВА этого генотипа были обнаружены на территории России в Новосибирске, Омске и Смоленске [11]. В Нижнем Новгороде циркуляция ротавируса с генотипом P[6] была установлена в рамках данной работы в период 2019-20 гг.

На территории Нижнего Новгорода ротавирусы с генотипом P[9] гена VP4 в минорном количестве выявляются практически каждый эпидемический год. На территории России эти штаммы циркулируют в комбинациях с G3, G6, G1 и G4.

Таким образом, российские ротавирусы несут шесть аллелей гена VP4 четырех генотипов: P[8]-3, P[8]-4, P[4]-IVa, P[4]-IVb, P[6], P[9], в отличие от вакцинных штаммов имеющих аллели P[8]-1 (Rotarix®) и P[8]-2 (RotaTeq®).

2.3 Филодинамическая характеристика ротавируса А на основе гена белка внутреннего капсида VP6

Филодинамический анализ позволяет рассчитать скорость эволюционных процессов, происходящих в вирусной популяции, оценить накопление мутаций и генетическое разнообразие с течением времени. Поскольку в настоящее время VP6 рассматривается как один из основных протеинов при формировании протективного иммунитета (Глава I, раздел 3), научно-практический интерес

представляло оценить филогенетические характеристики российской популяции РВА на основе этого белка.

Филогенетический анализ. Ген VP6 имеет размер 1,6 т.п.н., кодирует групповой и субгрупповой антигены. На основе анализа нуклеотидной последовательности различия, превышающие 19 %, позволяют говорить о разных генотипах VP6 ротавируса вида А. К настоящему времени известно 26 генотипов VP6 РВА (I1 – I26), изолированных от человека и животных. Несмотря на генотиповое многообразие ротавирусов, эпидемически значимые варианты относятся к двум генотипам VP6: Wa-подобные ротавирусы (1 геногруппа) и DS-1-подобные ротавирусы (2 геногруппа), имеющие разное происхождение. Первая геногруппа берет свое начало от ротавируса свиней, а вторая от РВА крупного рогатого скота [18, 222]. В составе вакцины Rotarix®, основанной на Wa-подобном штамме 89-12 ротавируса человека, VP6 относится к первой геногруппе (генотип I1). В составе RotaTeq®, основанной на DS-1-подобном штамме WC3 бычьего ротавируса, VP6 всех пяти штаммов, входящих в состав вакцины, относится ко второй геногруппе (генотип I2).

Для изучения разнообразия аллелей гена VP6 российских ротавирусов, были проанализированы нуклеотидные последовательности, доступные в базе данных GenBank. В выборку вошли нуклеотидные последовательности гена VP6 вакцинных штаммов (RotaTeq® и Rotarix®), а также 262 последовательности гена VP6, доступные в базе данных GenBank ротавирусов, изолированных после 2010 года на территории России в городах: Нижний Новгород (30), Новосибирск (203), Омск (29), Смоленск (4), Ханты-Мансийск (3). В исследуемой выборке 206 последовательностей гена VP6 принадлежали генотипу I1 и 56 генотипу I2.

Для оценки кластеризации российских штаммов и их взаимоотношений со штаммами в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix®, на основе общей выборки, включавшей генотипы I1 и I2, было сконструировано филогенетическое дерево, представленное на рисунке 12. Вакцинный штамм Rotarix® кластеризуется отдельно от российских ротавирусов дикого типа. Апостериорная вероятность узла с ближайшими российскими вариантами, вошедшими в малочисленную группу I1-

2, составила 0,42, что не позволяет достоверно говорить о родстве этих штаммов. Аллель I1-1 объединяет большинство российских штаммов, изолированных в разных регионах, в том числе, в Нижнем Новгороде в 2010-18 гг. К линии I1-2 принадлежат штаммы с генотипами G4P[8] и G1P[8], изолированные в Новосибирске 2010 гг. В группу I1-3 вошли ротавирусы с генотипом G4P[6], выделенные в Новосибирске в 2010-12 гг.

Ротавирусы второй геногруппы на филогенетическом дереве представлены тремя кластерами с апостериорной вероятностью 0,99: I2-1 – I2-3. Вакцинные штаммы в составе RotaTeq® относятся к сублинии I2-2, так же, как и два новосибирских изолята, выделенных в 2010 году. Большинство российских РВА второй геногруппы по гену VP6 принадлежат аллелю I2-1. Сублиния I2-3 представлена штаммами с генотипом G3P[9], изолированными в Нижнем Новгороде, Омске и Новосибирске в 2010-16 гг.

Таким образом, филогенетический анализ, проведенный на основе выборки штаммов, изолированных на территории России, позволил достоверно выделить три линии внутри генотипа I1 (I1-1 – I1-3) и три линии внутри генотипа I2 (I2-1 – I2-3). Большинство российских штаммов I1 генотипа принадлежат линии I1-1. Штамм в составе вакцины Rotarix® вошел в кластер I1-2 с последовательностями, изолированными в 2010 году в Новосибирске, и не получившими широкого распространения. Вакцинные штаммы RotaTeq® сформировали отдельный кластер I2-2, в который также попали два изолята из Новосибирска, датированные 2010 годом. Остальные РВА генотипа I2 несут аллели I2-1 и I2-3.

Скорость накопления мутаций и tMRCA – это филодинамические характеристики, которые были рассчитаны с помощью Байесовского анализа. Наблюдение за этими параметрами позволит установить возможные изменения в вирусной популяции. Например, установленный высокая скорость накопления мутаций генотипа G9 (ген VP7) в 2010 году, тогда еще редкого генотипа, позволил спрогнозировать его высокое распространение по всему миру [225].

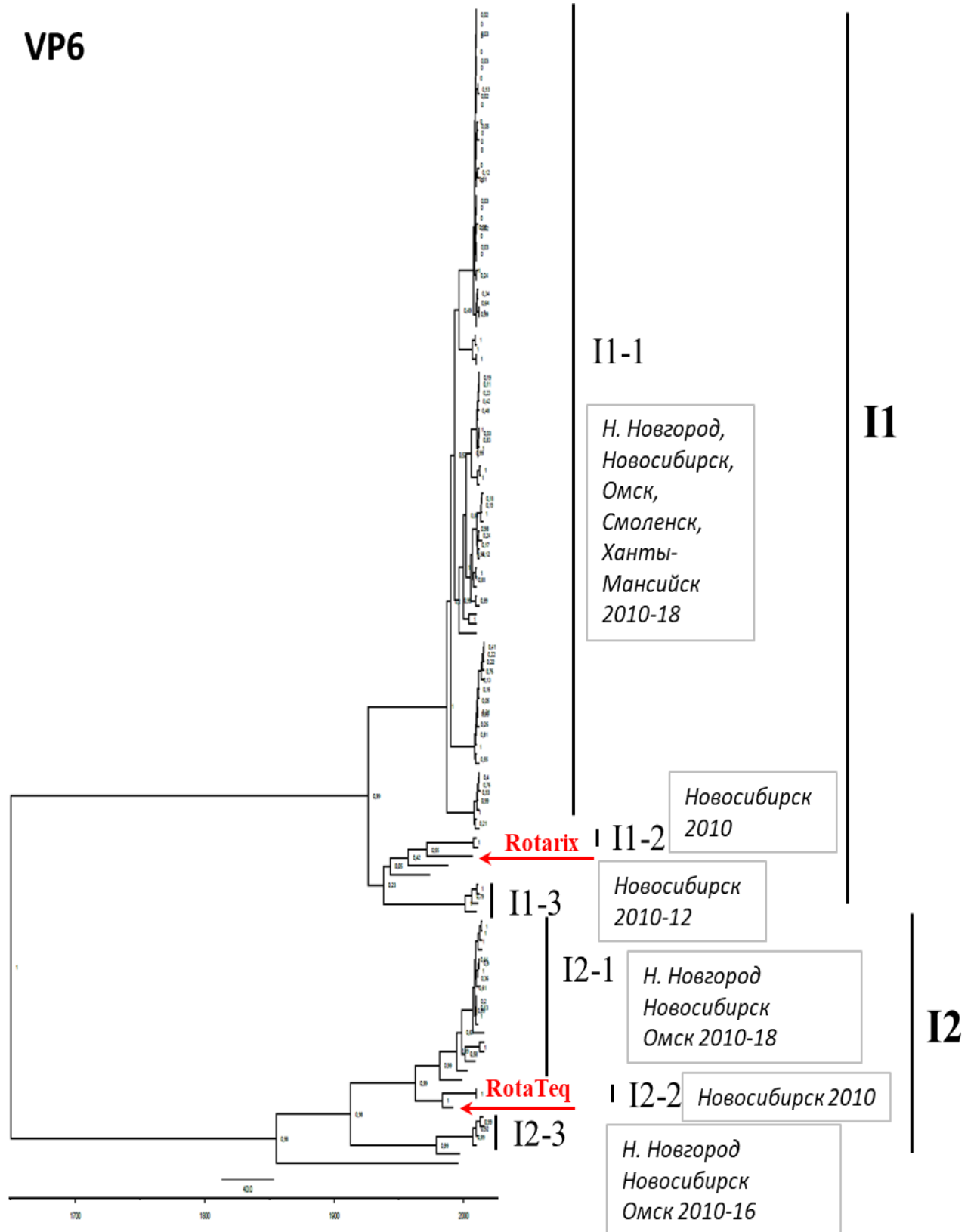


Рисунок 12. Байесово МСС филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP6 российских РВА дикого типа и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq®.

Скорость накопления мутаций у российских штаммов с генотипом I1 был немного ниже, чем у генотипа I2: $7,732E-4$ и $1,008E-3$, соответственно (таблица 13). Для каждой линии внутри генотипа уровень мутаций варьировал слабо. Что говорит о стабильности внутри аллелей у гена VP6.

Время циркуляции ближайшего общего предка (*tMRCA* - the most recent common ancestor) датируется 1983 годом для кластера I1-1, включающего большинство российских РВА генотипа I1, 1973 годом для кластера I1-2 (которому принадлежит штамм в составе вакцины Rotarix®) и 1951 – для штаммов с аллелем I1-3 гена VP6. Линия I2-1, которая включает большинство российских РВА второй геногруппы, имеет *tMRCA* в 1992 году. Линия I2-2, включающая вакцинный штамм RotaTeq®, имеет общего предка в 1967 году. Аллель I2-3 имеет ближайшего общего предка, который датируется 1910 годом (Таблица 13).

Таблица 13

Скорость накопления мутаций и время циркуляции ближайшего общего предка, рассчитанные на основе Байесовской филогенетической реконструкции

Генотип (Сублиния)	Скорость накопления мутаций в кластере сублиний (замен/на сайт/в год)	<i>tMRCA</i> кластера (95% HPD)
I1	$7,732E-4$	
I1-1	$1,098E-3$	1983 (1966-1993)
I1-2	$9,172E-4$	1973 (1952-1988)
I1-3	$1,002E-3$	1951 (1899-1985)
I2	$1,008E-3$	
I2-1	$1,197E-3$	1992 (1974-2003)
I2-2	$1,058E-3$	1967 (1915-1994)
I2-3	$1,761E-3$	1910 (1795-1981)

Эффективный размер популяции – это абстрактная величина, которая позволяет измерить размер популяции на основе генетического разнообразия в рамках идеализированной модели и реконструировать прошлую популяционную динамику [136]. Этот параметр позволяет измерить генетическое разнообразие и его колебание во времени на основе исследуемых геномных данных. Анализ эффективного размера популяции может быть использован для того, чтобы ретроспективно установить дату начала эпидемии, а также отследить эффективность действий служб и принятых мер по противодействию распространения инфекции [122, 271].

Графики демографической истории, реконструированные на основе нуклеотидных последовательностей гена VP6 российских ротавирусов с использованием модели SkyGrid и Байесовского анализа, не позволяют выявить различия между штаммами, принадлежащими первой и второй геногруппам (Рисунок 13). Обе популяции характеризуются долговременными стабильными показателями. Ротавирусы с генотипом I1 имели тенденцию к небольшому росту эффективного размера популяции, а затем, на уровне 2000 года, произошло снижение этого показателя. РВА с генотипом I2 аналогично показали небольшое снижение эффективного размера популяции после 2000 года.

Снижение эффективного размера популяции РВА после 2000х годов свидетельствует о снижении генетического разнообразия гена VP6. Эти данные подтверждаются филогенетическим анализом – большинство российских ротавирусов дикого типа, изолированные в период 2010-18 гг., несут аллели I1-1 и I2-1. В кластеры I1-2 и I2-2 вошли вакцинные штаммы Rotarix® и RotaTeq®, соответственно. Сублиниям I1-3 и I2-3 принадлежали немногочисленные изоляты, не получившие широкого распространения. В условиях низкого охвата вакцинацией, снижение эффективного размера популяции может быть, в том числе, связано с цикличностью эпидемического процесса, определяемого естественным снижением активности циркуляции ротавирусов доминирующего типа под воздействием возрастающего коллективного иммунитета, что было ранее показано на примере нижегородской популяции РВА [17].

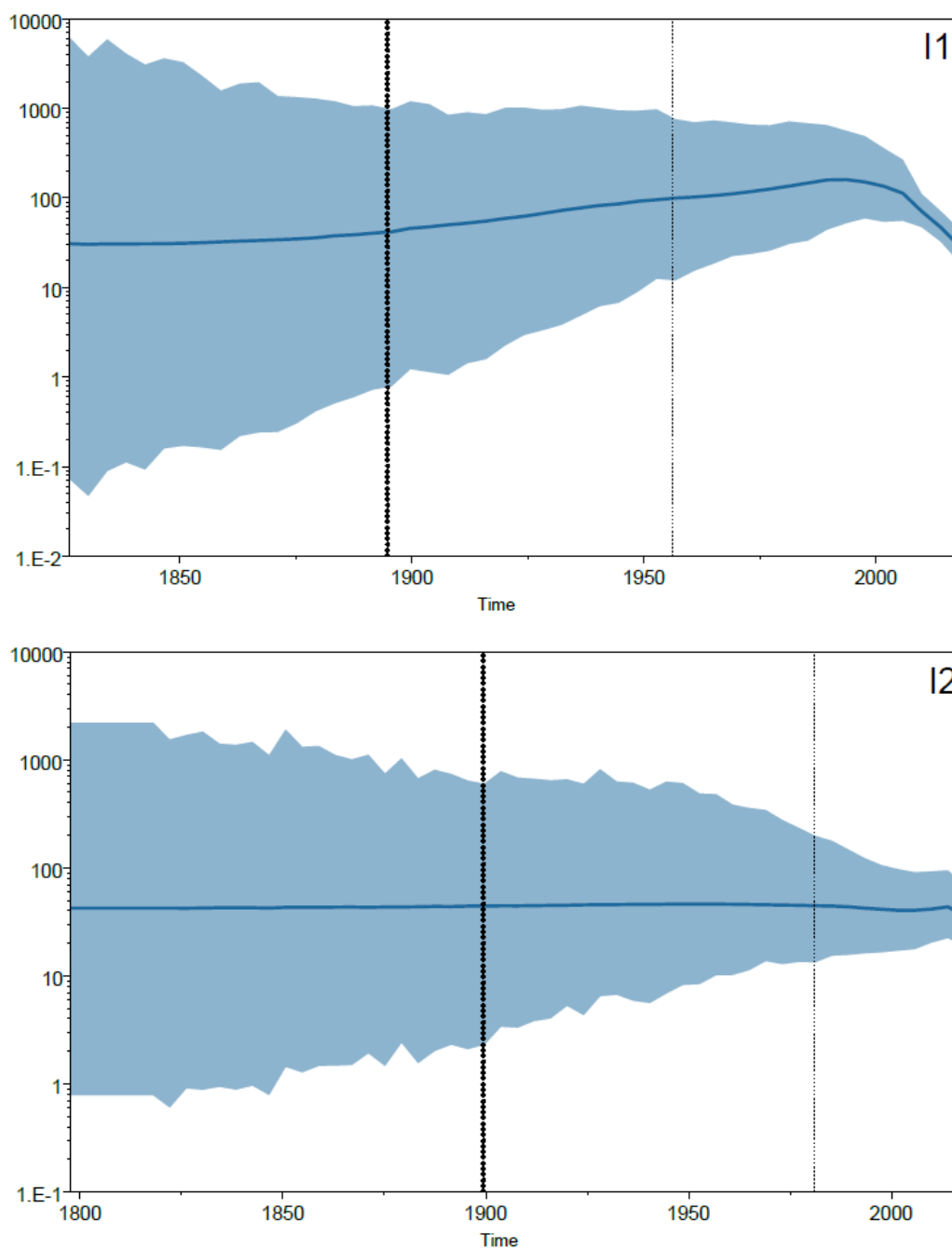


Рисунок 13. Реконструкция демографической истории гена VP6 с генотипами I1 и I2 на основе нуклеотидных последовательностей ротавирусов, циркулирующих в России. По оси y показан эффективный размер популяции вируса (N_e), представляющий количество геномов, эффективно способствующих возникновению новых инфекций. По оси x – календарные годы. Линия в центре отображает медианные значения в рамках 95 % интервала заданной плотности.

Таким образом, на территории России установлена циркуляция РВА с генотипами I1 и I2 гена VP6. Внутри каждого генотипа достоверно выделено по три линии. С вакцинными штаммами RotaTeq® и Rotarix® (относятся к линиям I2-2 и I1-2, соответственно) кластеризовались единичные российские изоляты, выделенные в Новосибирске в 2010 году и не получившие широкого распространения. Филогенетическое разнообразие и филодинамические характеристики российской популяции РВА позволяют сделать вывод о долговременной стабильности и консервативности гена VP6 генотипов I1 и I2.

2.4 Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена неструктурного белка NSP4

Ген NSP4 имеет размер 751 п.н. и кодирует протеин с множеством функций, таких как: энтеротоксин, виropорин, рецептор для однокапсидных частиц выполняющий функции транслокатора, является антигеном. Уровень различий нуклеотидных последовательностей, превышающий 15 %, говорит о разных генотипах гена NSP4. К настоящему времени установлено 27 генотипов NSP4 ротавируса А, изолированных от человека и животных [278].

Для изучения разнообразия аллелей гена NSP4 современных российских штаммов РВА и их взаимоотношений с вакцинными штаммами, была изучена выборка, в которую вошли 89 нуклеотидных последовательностей российских РВА, из которых 45 были изолированы на территории Нижнего Новгорода в период 1992-2016 гг. Перечень нижегородских штаммов приведен в Приложении (Таблица 4А).

На территории Нижнего Новгорода изолированы ротавирусы с генотипами E1, E2 и E3 (Рисунок 14). На филогенетическом дереве, реконструированном с использованием Байесовского анализа, внутри генотипа E1 можно выделить три аллеля (E1-1 – E1-3) с достоверностью 0,99. Вакцинный штамм Rotarix по гену

NSP4 относится к сублинии E1-1, при этом не кластеризуется со штаммами дикого типа, изолированными на территории России. Аллель E2-2 несут как нижегородские штаммы, так и ротавирусы, изолированные на территории Омска и Новосибирска. Аллель E1-3 несут штаммы с генотипом G4P[9], изолированные в Нижнем Новгороде, а также на территориях Ганы, Чешской республики, Китая, как от людей, так и от свиней. По гену NSP4 с генотипом E2 филогенетический анализ позволил установить гетерогенность нуклеотидных последовательностей. Достоверно можно говорить о четырех сублиниях гена NSP4 ротавирусов, выявленных как на территории Нижнего Новгорода, так и в других регионах России (E2-1 – E2-4). Штаммы, входящие в состав вакцины RotaTeq®, образовали отдельный достоверный кластер E2-5.

На территории Нижнего Новгорода нами были выявлены три изолята с генотипом E3 гена NSP4. Эти штаммы имели генотипы G3P[9] и G6P[9]. В международной базе GenBank не представлены нуклеотидные последовательности с генотипом E3 гена NSP4 ротавирусов, изолированных в других регионах России.

Таким образом, филогенетический анализ показал, что российские штаммы ротавируса А несут аллели генов VP4 и VP7, отличные от аллелей в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix®. Вместе с вакцинными линиями гена VP6 кластеризуются только единичные изоляты, выделенные в Новосибирске в 2010 году и не получившие дальнейшего распространения. Анализ гена NSP4 позволил установить, что российские штаммы несут восемь вариантов гена NSP4: E1-1, E1-2, E1-3, E2-1, E2-2, E2-3, E2-4, E3. Штаммы в составе вакцины RotaTeq® образовали отдельный кластер E2-5, в который не вошли российские изоляты, представленные в базе данных GenBank. Штамм вакцины Rotarix® несет аллель E1-1, который, однако, кластеризуется отдельно от российских вариантов дикого типа, принадлежащих этой же линии.

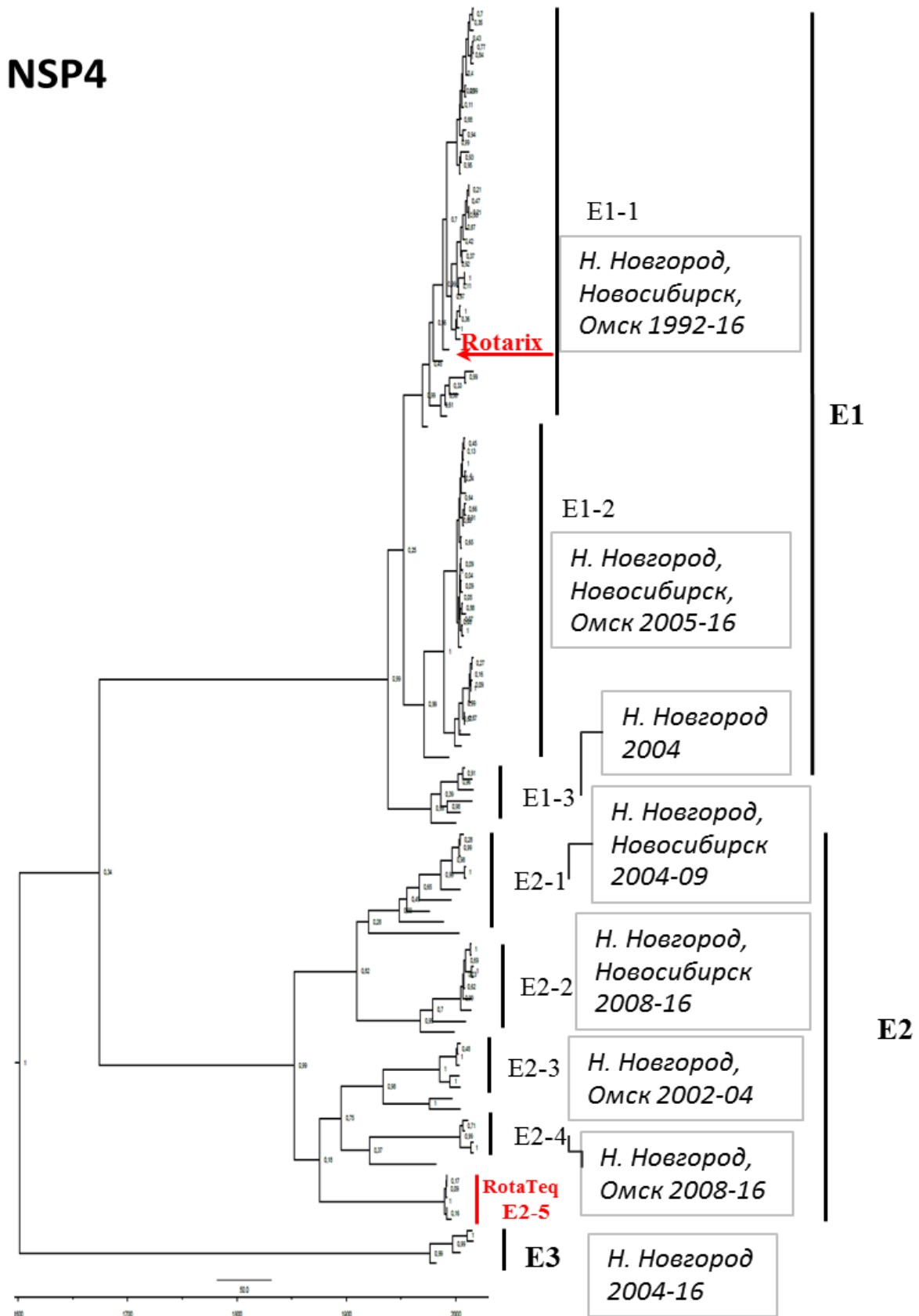


Рисунок 14. Байесово MCC филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена NSP4 российских РВА дикого типа и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq®.

3 Анализ антигенных эпитопов вакцинных и российских штаммов РВА дикого типа

В настоящей работе проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей в области нейтрализующих конформационных антигенных эпитопов белков VP7, VP4 и VP6 и линейных эпитопов белков VP7, VP6 и NSP4 российских штаммов дикого типа и штаммов в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix®. Для анализа были использованы выведенные аминокислотные последовательности, полученные с помощью программного обеспечения MEGAX [193].

3.1 Сравнительный анализ нейтрализующих антигенных эпитопов

Антигенные композиции существующих и кандидатных ротавирусных вакцин обычно базируются на двух поверхностных протеинах (VP7 и VP4). В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что ротавирусы, относящиеся к разным субгенотиповым линиям, способны индуцировать разный серологический ответ [42, 163, 176]. В связи с тем, что вакцинные штаммы обеих лицензированных вакцин были изолированы более 30 лет назад, иммунный ответ, сформированный в результате вакцинации, может быть недостаточно эффективен в отношении двух поверхностных белков капсида «диких» вариантов РВА. Накопление мутаций в геноме у современных ротавирусов может дать начало антигенным изменениям, которые способны подорвать эффективность вакцинации в долгосрочной перспективе. В данном разделе проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей в сайтах антигенной нейтрализации двух поверхностных белков VP4 и VP7. Местоположение рассмотренных эпитопов было определено ранее в ряде работ [39, 112, 186, 229].

3.1.1 Нейтрализующие антигенные эпитопы белка VP7

На белке VP7 установлено три нейтрализующих антигенных эпитопа: 7-1а, 7-1b и 7-2 (Рисунок 3). Мы провели сравнительный анализ аминокислотного состава в этих регионах у вакцинных и штаммов РВА дикого типа с генотипами G1, G2, G3, G4 и G9, изолированных на территории России. Для анализа эпитопов антигенной нейтрализации была исследована выборка из 470 штаммов (124 РВА, изолированных в Нижнем Новгороде, и 346 РВА, изолированных в других регионах России), описанная в разделе 2.1.

G1. Анализ аминокислотной последовательности VP7 ротавирусов с генотипом G1 показал, что из 29 аминокислот, составляющих нейтрализующие эпитопы, две различаются у вакцин RotaTeq® и Rotarix®: E97D и N147S в регионах 7-1а и 7-2, соответственно. Российские ротавирусы с генотипом G1 в этих двух позициях аналогично с вакцинным штаммом Rotarix® несут аминокислоты 97E и 147N (Рисунок 15А). Визуализация замен в эпитопах антигенной нейтрализации между дикими и вакцинными штаммами приведена на рисунке 15Б.

При анализе аминокислотной последовательности антигенных регионов установлены единичные или случайные мутации, т.е. мутации, которые встречались у одного или нескольких штаммов из выборки и не коррелировали с принадлежностью к отдельной филогенетической линии. Единичные мутации (отмечены знаком ○) были показаны в позициях: 99, 100, 291(7-1а); 212, 213, 238 (7-1b); 147, 148 (7-2) (Рисунок 15).

На рисунке 15А розовым цветом выделены ячейки, соответствующие ключевым аминокислотным остаткам для связывания антител. Аминокислотные остатки в позициях 94N, 123S и 217M у вакцинных и российских вариантов дикого типа различались согласно принадлежности линии G1-1 и G1-2. Ротавирусы линии G1-2 несли в указанных позициях аминокислоты, аналогичные вакцинным штаммам.

Штамм	Антигенные эпитопы и их аминокислотные позиции																												
	7-1a														7-1b						7-2								
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264
Rotarix G1	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
RotaTeq G1	T	T	N	G	D	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	S	L	S	M	N	G
RUS_G1-1	.	.	S	.	E	.	○	○	.	N	.	.	.	○	.	.	○	○	○	N/○	○	.	T	.	.
RUS_G1-2	E	.	○	○	○	.	.	○	○	○	N/○	○
			●							●																		●	
			▲		▲					▲														▲				▲	
RotaTeq G2	A	N	S	D	E	W	E	N	Q	D	T	M	N	K	Q	D	V	S	N	S	R	D	N	T	S	D	I	S	G
RUS_IV-a1	T	.	.	N	D	.	S
RUS_IV-a3	T	.	.	N	D	.	N
			●	●	●		●	●		●	●	●	●			●				●	●		●	●	●	●	●	●	●
	▲			▲													▲			▲									
RotaTeq G3	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	N	K	D	K	D	A	T	L	S	E	A	G
RUS_G3-3a	T	T/○	.	N/○	N/○	.	.	○	○	.
RUS_G3-3e	S	T/○	.	N/○	N/○	.	.	○	○	.
			●	●	●					●	●					●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●
	▲																▲		▲		▲								
RotaTeq G4	S	T	S	T	E	W	K	D	Q	N	L	I	D	K	Q	D	T	A	D	T	R	A	S	G	E	S	T	S	G
RUS_G4 Ic	E	.	.	N	K	T	○	.	.
RUS_G4 II	.	.	.	N	V	.	.	.	N	○	.	.
			●	●	●					●	●	●	●				●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●
													▲			▲					▲	▲							
RUS_G9	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N	K	D	S	T/○	L	S	E	S	G
Rotarix			●	●						●	●	●				●	●	●	●				●	●			●	●	
RotaTeq G1			▲	▲	▲					▲	▲	▲				▲	▲	▲	▲	▲			▲	▲			▲	▲	
RotaTeq G2	▲	▲					▲	▲					▲				▲	▲	▲	▲	▲		▲	▲			▲	▲	
RotaTeq G3			▲	▲	▲								▲				▲	▲	▲	▲	▲			▲			▲	▲	
RotaTeq G4	▲		▲							▲	▲					▲				▲	▲	▲		▲	▲			▲	▲

Рисунок 15. А. Аминокислотные последовательности сайтов антигенной нейтрализации VP7 вакцинных штаммов Rotarix®, RotaTeq® и современных штаммов РВА, циркулирующих на территории России. Цифрами указан порядковый номер аминокислоты. (○) показаны единичные мутации, (▲) показано наличие аминокислотной замены в сравнении со штаммом RotaTeq®, (●) показано наличие замены в сравнении со штаммом Rotarix®. Розовым цветом выделены аминокислоты, ключевые для связывания антител (escape-mutations).

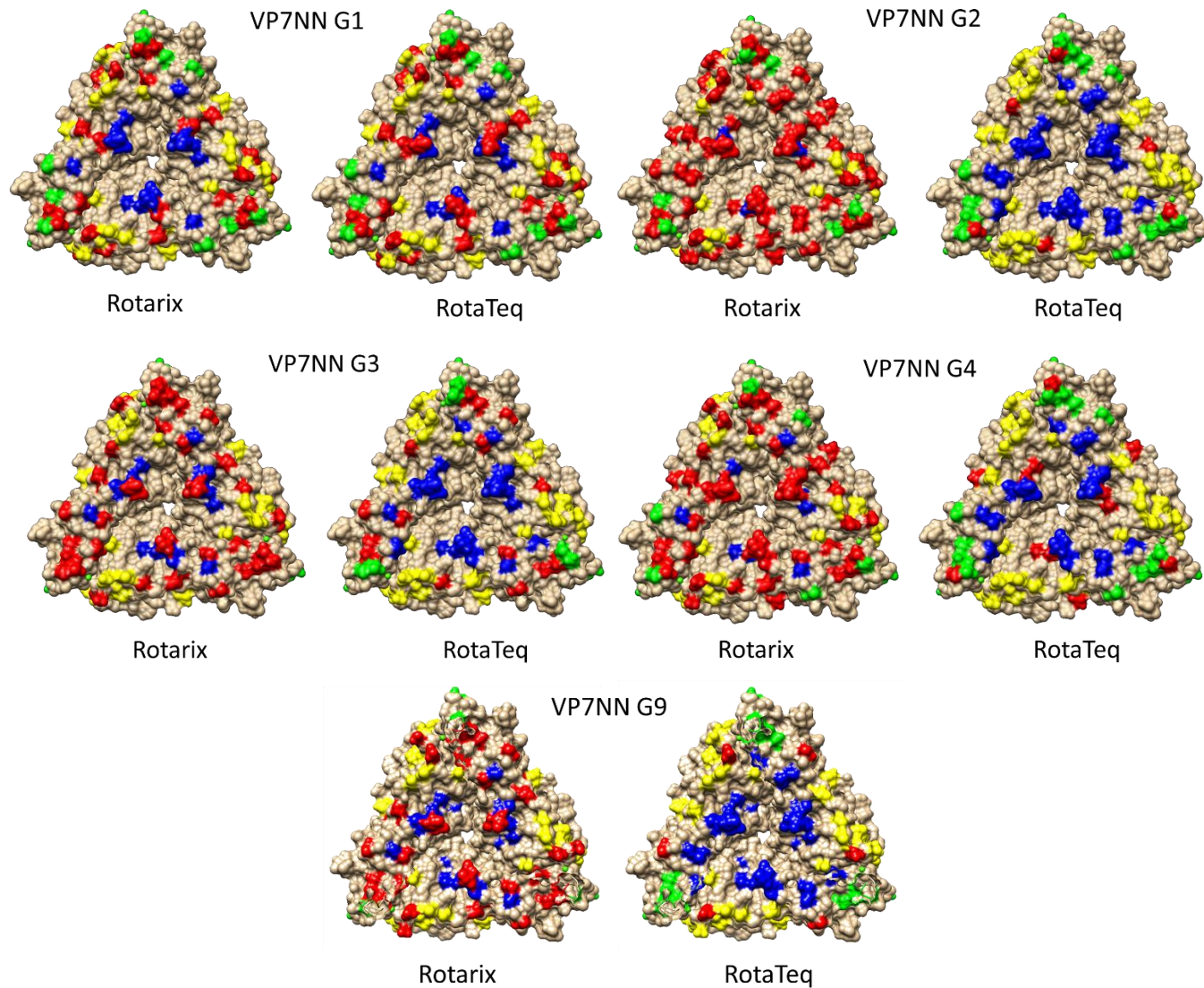


Рисунок 15. Б. Аминокислотные замены (показаны красным) в антигенных сайтах нейтрализации белка VP7 у вакцинных и российских штаммов разных антигенных вариантов.

PBA линии G1-1 несли в этих позициях аминокислотные замены: N94S, S123N, M217T (Рисунок 8, 15 А). Позиции 94 и 217 являются критичными для связывания нейтрализующих антител [39].

G2. У российских ротавирусов и вакцинного штамма SC-2 (G2) RotaTeq® различаются четыре аминокислоты в позициях A87T, D96N и S213D, S242N в регионах 7-1a и 7-1b, соответственно. Две из них (96 и 213 а.о.) являются критичными для связывания с антителами. В позиции 242 ротавирусы линии G2-IVa-1 несут серин (S), а линии G2-IVa-3 – аспарагин (N).

Вакцина Rotarix® основана на штамме ротавируса с генотипом G1 и не содержит в своем составе компонентов VP7 других G-генотипов. Представляло научно-практический интерес оценить уровень различий в области антигенных эпитопов у российских ротавирусов дикого типа с доминирующими генотипами (G2, G3, G4, G9) и штамма G1 в составе Rotarix®. При сравнении штаммов ротавирусов с генотипом G2, изолированных в Нижнем Новгороде, и вакцинного штамма Rotarix® выявлены 18 аминокислотных замен во всех трех антигенных сайтах.

Анализ выборки PBA, изолированных в других регионах России, не выявил других отличий в рассматриваемых протективных эпитопах. Интересно, что среди всех исследованных штаммов с генотипом G2 в сайтах антигенной нейтрализации не было установлено единичных аминокислотных замен.

G3. Сравнительный анализ российских PBA генотипа G3 с вакцинным штаммом WI78 (G3) в составе RV5 выявил четыре различающихся аминокислоты в регионах 7-1a и 7-1b, в то время как с вакцинным штаммом RIX4414 – наличие 13 аминокислотных замен в сайтах 7-1a, 7-1b и 7-2. В позиции 87 штаммы дикого типа, принадлежащие линиям G3-1 и G3-3e, несут аминокислоту серин, а представители линии G3-3a и штамм вакцины RotaTeq® – треонин. В позициях 212, 238, 242, 146, 221 у единичных штаммов, изолированных в Нижнем Новгороде, присутствуют мутации (показаны ○ на Рис. 15А). В позициях 213, 146, 147, 148, 190, 221 у единичных штаммов, изолированных в других регионах России, показаны мутации. Следует отметить, что в позиции 238 у большинства российских

штаммов присутствует аспарагин так же, как у вакцинного штамма Rotarix®. У вакцинного штамма G3 RotaTeq® в этой позиции находится лизин. Полученные результаты сходны с исследованиями, проведенными в Бельгии и Тунисе [236, 335]. Конформационно позиция 238 окружена аминокислотными остатками эпитопа 7-1а и потенциально может быть гликозилирована. Этот процесс может привести к изменению антигенных свойств этого эпитопа [335].

G4. Ротавирус с генотипом G4 продолжительное время является одним из доминирующих на территории России и несет стабильные аллели генов VP4 и VP7 [23]. Все штаммы PVA генотипа G4, изолированные на территории Нижнего Новгорода, относятся к линии G4-Ic и имеют высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей. При наличии замены в той или иной позиции, она присутствует у всех образцов, т.е. является генотип специфической. Всего было обнаружено 4 замены в сравнении с вакцинным штаммом BrB (G4) в составе RotaTeq® и 16 аминокислотных различий в сравнении с вакцинным штаммом Rotarix®. В других регионах России выявлены G4 штаммы PVA, относящиеся к линии G4-II. Этот вариант вируса несет ряд аминокислотных различий в сравнении с линией G4-Ic: 96N, 129V, 130D, 143R, 145A. В выборке нижегородских штаммов дикого типа показана одна единичная мутация в позиции 217. При анализе других российских штаммов единичные замены показаны в позициях: 87, 100, 104, 291, 212, 213, 238, 146, 217, 221.

G9. В последнее десятилетие генотип G9 получил широкое распространение и стал одним из шести глобальных типов PVA. Штаммы с генотипом G9 не входят в состав вакцин Rotarix® и RotaTeq®.

Проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей в области сайтов антигенной нейтрализации между штаммами G9 дикого типа, которые были изолированы в Нижнем Новгороде и других регионах России, а также вакцинным штаммом Rotarix® и для каждого из четырех генотипов в составе вакцины RotaTeq® (G1, G2, G3 и G4). Между российскими изолятами PVA и штаммом Rotarix® (с генотипом G1) было установлено 13 аминокислотных различий. Штаммы в составе вакцины RotaTeq® несут разное количество замен в

сравнении со штаммами дикого типа генотипа G9: для RV5-G1 показано 14 различий, RV5-G2 – 19 различий, RV5-G3 и RV5-G4 – по 11 различий.

В анализируемой выборке российских штаммов РВА генотипов G1, G2, G3, G4 и G9, и вакцинных штаммов RotaTeq® и Rotarix® полностью консервативны были четыре аминокислотных остатка (98W, 104Q, 201Q, 264G).

Ротавирусная инфекция и иммунизация индуцируют сильный специфический ответ на белок VP7. Действие нейтрализующих антител основано на том, что, прикрепляясь к VP7, они стабилизируют тример, блокируя раздевание вириона [39]. Антигенные регионы 7-1 и 7-2 вместе покрывают большую часть наружной поверхности VP7, приводя к тому, что у разных серотипов вируса в этой области отсутствуют консервативные участки [Aoki et al., 2009]. Ранее в нейтрализующих эпитопах белка VP7 были установлены ключевые позиции аминокислот, замены в которых приводят к избеганию вирусом иммунного ответа (escape-mutation). На рисунке 15А позиции этих аминокислотных остатков выделены розовым цветом. Поскольку вакцина Rotarix® является моновалентной (G1 генотип), сравнительный анализ с дикими штаммами генотипов G2, G3, G4 и G9 показал большее количество различий в аминокислотном составе антигенных эпитопов, по сравнению с пентавалентной вакциной RotaTeq®.

В настоящее время отсутствуют данные, позволяющие оценить влияние аминокислотных замен в антигенных эпитопах VP7 РВА на формирование протективного иммунитета. Белок VP7 ротавируса несет на своей поверхности как серотип-специфические сайты, так и участки перекрестной нейтрализации. Одна из широко применяемых во всем мире вакцин RotaTeq® предположительно достигает своей эффективности в условиях циркуляции ротавирусов разных генотипов благодаря разнообразию экспрессируемых антигенов. Сравнительный анализ аминокислотного состава в области нейтрализующих эпитопов VP7 российских штаммов и моновалентной вакцины Rotarix® показал наличие относительно большого количества аминокислотных замен. Ранее было показано формирование гетеротипического иммунитета при вакцинации Rotarix® [103, 104].

Таким образом, в работе проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей в области нейтрализующих эпитопов белка VP7 РВА генотипов G1, G2, G3, G4 и G9: 124 последовательностей РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода, 346 последовательностей РВА, циркулирующих в других регионах России, нуклеотидных последовательностей штаммов вакцин RotaTeq® и Rotarix®. Между российскими штаммами с генотипом G1 и штаммами в составе вакцин показано 5 и 3 аминокислотных различия, соответственно. В регионах антигенной нейтрализации количество аминокислотных различий между современными российскими штаммами ротавирусов и вакциной Rotarix® различалось в зависимости от генотипа штамма и составило: G2 (13 замен), G3 (13 замен), G4 (16 замен) и G9 (13 замен). Благодаря вариативной композиции антигенного состава пентавалентной вакцины RotaTeq®, в сайтах антигенной нейтрализации было установлено меньшее (относительно Rotarix®) количество различий с российскими ротавирусами: по четыре аминокислотных различия со штаммами генотипов G2, G3 и G4. Сравнительный анализ аминокислотного состава в области сайтов антигенной нейтрализации компонентов вакцины RotaTeq® и РВА с генотипом G9, изолированных в России, показал наличие 14 различий с вакцинным штаммом G1, 19 – с штаммом G2 и по 11 с компонентами VP7 генотипов G3 и G4.

3.1.2 Нейтрализующие антигенные эпитопы белка VP4

Нейтрализующие антигенные эпитопы домена VP8* 8-1 – 8-4 включают 25 аминокислот (Рисунок 3). В ротавирусной популяции основную долю составляют штаммы с генотипом P[8]. На втором месте по распространенности стоят штаммы с генотипом P[4], которые не представлены в вакцинах Rotarix® и RotaTeq®.

Выборка штаммов, составленная для анализа аминокислотной последовательности в области антигенных эпитопов описана в разделе 2.2. В

анализ были взяты: 48 последовательностей VP4 штаммов РВА, изолированных на территории Нижнего Новгорода, и 480 последовательности гена VP4 P[8] генотипа ротавирусов, выделенных в других регионах России.

В нашем исследовании при сравнительном анализе аминокислотного состава российских ротавирусов с генотипом P[8] и вакцинных штаммов в составе RotaTeq® и Rotarix® показано, что регионы 8-2 и 8-4 состоящие из двух и трех аминокислотных остатков, соответственно, не содержат различий с вакцинными штаммами. Различия в аминокислотной последовательности между вакцинными и исследуемыми штаммами сосредоточены в участках: 8-1 и 8-3 (Рисунок 16А). Всего показано наличие четырех различий с вакциной RotaTeq® и 6 с вакциной Rotarix®. В позициях 116 и 183 у нижегородских штаммов находятся единичные мутации. У других российских штаммов единичные мутации показаны в позициях 150, 192, 115, 125, 135 и 87. В позициях 194, 195 и 113 как у нижегородских штаммов дикого типа, так и у российских изолятов, выделенных в других регионах России, находятся аминокислоты D194N, G195D, D113N. Установленные мутации в этих позициях не коррелируют с принадлежностью рассматриваемых изолятов к той или иной сублинии. Визуализация аминокислотных замен между вакцинными штаммами и российскими ротавирусами дикого типа представлена на глобулярном домене VP8* белка VP4 (Рисунок 16Б).

Вакцины Rotarix® и RotaTeq® не содержат в своем составе компонента VP4 с генотипом P[4]. Поскольку штаммы с генотипом P[4] занимают второе место по распространенности в России и мире, и преобладали на территории Нижнего Новгорода в 2017-18 гг., научно-практический интерес представляло сравнение аминокислотного состава вакцинных штаммов и штаммов дикого типа с генотипом P[4] в области сайтов антигенной нейтрализации. Сравнительный анализ аминокислотного состава в области нейтрализующих эпитопов позволил установить 10 аминокислотных различий между дикими российскими штаммами и вакцинным штаммом RotaTeq® и 12 аминокислотных различий со штаммом P[8] в составе Rotarix®. В позициях 87 и 114 аминокислотные различия были связаны с принадлежностью к аллелям P[4]-IVa (87S и 114Q) и P[4]-IVb (87N и 114P).

А

Штамм	Антигенные эпитопы и их аминокислотные позиции																										
	8-1											8-2		8-3								8-4					
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89		
Rotarix	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	T	A	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N		
RotaTeq	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N		
RUS_P[8]	▪	▪	▪	D/○	▪	▪	▪	▪	D/N	G/D	▪	▪	○	D/N	▪	▪	○	▪	R	▪	▪	D	▪	▪	▪		
Rotarix				●					●	●				●					●						●		
RotaTeq				▲					▲	▲				▲													
RUS_P[4]-VIa	▪	▪	▪	D	▪	▪	D/○	▪	▪	▪	▪	▪	▪	S	Q	T	N	N	E	▪	S	D	S	▪	D		
RUS_P[4]-VIb	▪	▪	▪	D	▪	▪	D/○	▪	▪	▪	▪	▪	▪	S	▪	T	N	N	E	▪	S	D	▪	▪	D		
Rotarix				●					●					●	●	●	●	●	●		●	●	●		●		
RotaTeq				▲					▲					▲	▲	▲	▲		▲		▲			▲	▲		

Рисунок 16. А. Аминокислотные последовательности сайтов антигенной нейтрализации на участке VP8* вакцинных штаммов Rotarix®, RotaTeq® и современных штаммов дикого типа с генотипом P[8], циркулирующих на территории России. Цифрами указан порядковый номер аминокислоты. (○) показаны единичные мутации, (▲) показано наличие аминокислотной замены в сравнении со штаммом RotaTeq®, (●) показано наличие замены в сравнении со штаммом Rotarix®

Б

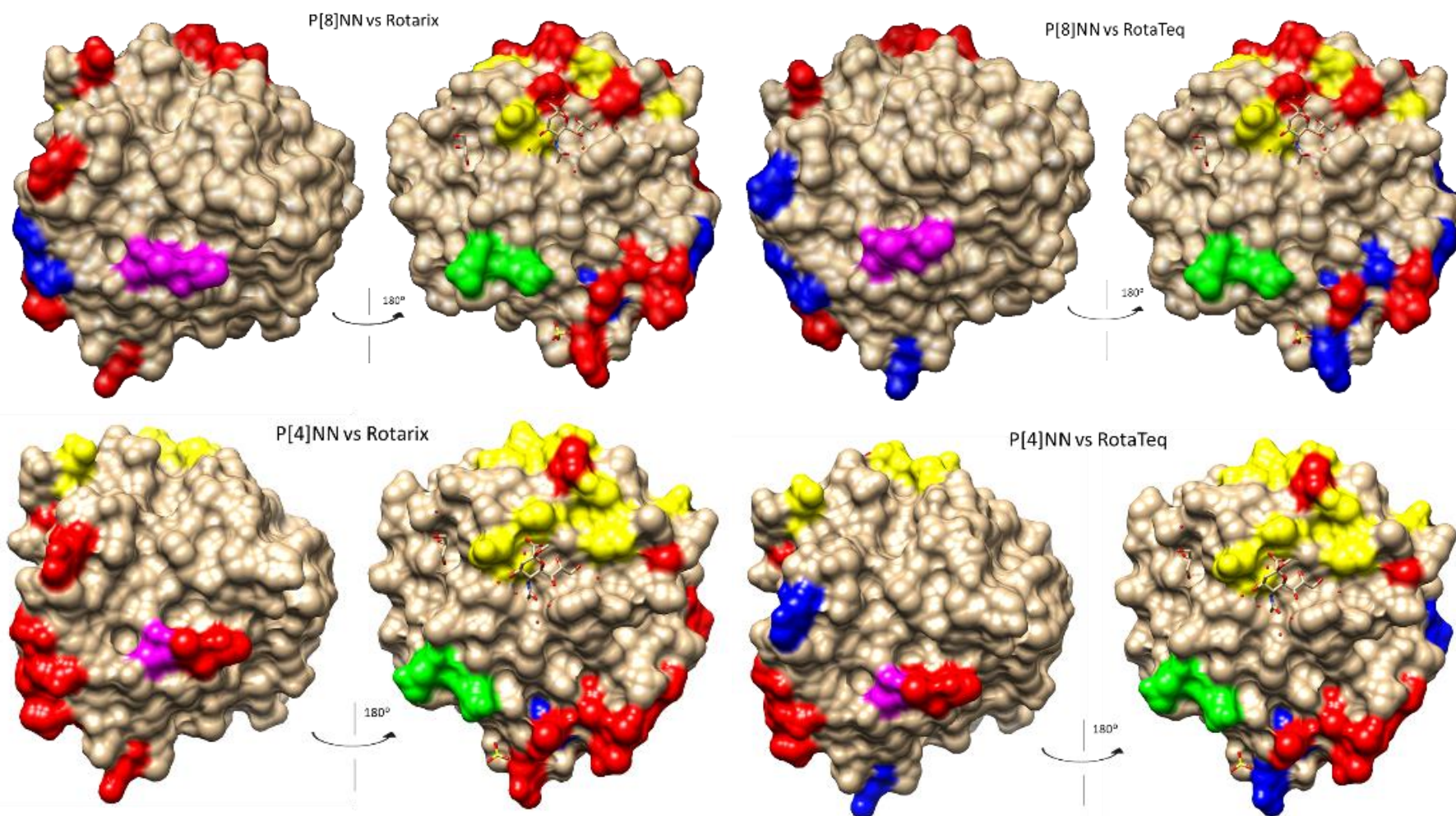


Рисунок 16 Б. Аминокислотные замены (показаны красным) в сайтах нейтрализации белка VP8* у вакцинных и российских штаммов разных антигенных вариантов.

Сравнительному анализу аминокислотного состава нейтрализующих эпитопов диких и вакцинных штаммов РВА посвящен ряд исследований. Подобные работы проводились на территории Бельгии, Туниса, Индии, Саудовской Аравии [28, 192, 236, 335]. Все исследования показали наличие в регионах антигенных детерминант аминокислотных различий между современными циркулирующими и вакцинными штаммами.

На территории Бельгии специфическая профилактика ротавирусной инфекции вакцинами RotaTeq® и Rotarix® включена в национальный календарь с 2007 года. Анализ сайтов антигенной нейтрализации белков VP7 и VP4 штаммов, изолированных в Бельгии в 2008-09 годах, и штаммов RotaTeq® и Rotarix®, показал наличие замен [335], которые аналогичны заменам, установленным для современных штаммов РВА, выявленных в Нижнем Новгороде. При этом в Бельгии была показана высокая эффективность вакцинации с существенным снижением тяжелых случаев ротавирусного гастроэнтерита [66].

На территории Индии и Туниса вакцины RotaTeq® и Rotarix® лицензированы и доступны для применения на частном рынке, однако не входят в национальные календари прививок этих стран. В Саудовской Аравии преобладают РВА с генотипом G1P[8], вакцина Rotarix, массово применяемая для профилактики ротавирусного гастроэнтерита с 2013 года, хорошо себя зарекомендовала [334].

Таким образом, в ходе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белков наружного капсида VP7 и VP4 российских ротавирусов дикого типа и вакцинных штаммов Rotarix® и RotaTeq® в области нейтрализующих эпитопов, нами установлен ряд различий. На белке VP7 аминокислотные различия показаны во всех трех антигенных эпитопах 7-1a, 7-1b и 7-2. Кроме этого, у ряда нижегородских штаммов G3-генотипа наблюдается замена в позиции 238, что потенциально может приводить к ее гликозилированию и, как следствие, изменению антигенных свойств белка. Сравнительный анализ отдельных штаммов в составе вакцины RotaTeq® и российских штаммов с генотипом G9 показал, что многокомпонентный состав RotaTeq® существенно не повлиял на количество аминокислотных различий в области сайтов антигенной

нейтрализации. Количество аминокислотных различий вакцинных вариантов и G9 штаммов дикого типа было сравнимо у моновалентной вакцины Rotarix® и отдельных компонентов RotaTeq®.

На белке VP4 аминокислотные различия нейтрализующих сайтов между вакцинными и нижегородскими штаммами с генотипом P[8] отмечены в двух эпитопах: 8-1 и 8-3. Количество замен составило 6 аминокислот с вакциной Rotarix® и 4 с вакциной RotaTeq®. Российские штаммы с генотипом P[4] отличались от вакцин Rotarix® и RotaTeq® на 12 и 10 аминокислот, соответственно. В целом, сравнение штаммов дикого типа и вакцинных вариантов показывает существенно меньшее количество различий, если они принадлежат одному генотипу.

В последнее десятилетие сразу два генотипа VP7 вошли в состав глобальных штаммов PVA - G9 и G12. Кроме этого в ряде регионов показана активизация циркуляции штаммов G2P[4] и реассортантов между первой и второй геногруппой. Сложная и разнообразная генотиповая структура ротавирусной популяции, приводит к вариативному составу эпитопов антигенной нейтрализации. Однако, помимо белков наружного капсида VP7 и VP4, показана роль других структурных и неструктурных белков, способных индуцировать защитный иммунный ответ, в частности VP6 и NSP4 [177, 246].

3.1.3 В-клеточные антигенные эпитопы белка VP6

Внутренний капсид ротавируса имеет икосаэдрическую симметрию (T=13) и образован 260 тримерами белка VP6. Полипептидная цепь VP6 свернута в два домена. Домен В у основания молекулы состоит из двух сегментов аминокислотной цепи: 1-150 а.о. N-конца и 335-397 а.о. С-конца. Домен Н находится в верхней части молекулы и образован 151-334 а.о. Тримеры VP6 обладают способностью специфически взаимодействовать между собой, а также с

вирусными структурными белками VP2, VP4 и VP7. Участки взаимодействия обладают наиболее консервативными остатками полипептидной цепи [76, 105, 221]. Также на протеине VP6 установлены функционально-значимые домены: 246-314 а.о. домен тримеризации VP6; 251-397 а.о. – домен сборки [30, 86].

В нашей работе мы провели сравнительный анализ аминокислотного состава области антигенных эпитопов белка VP6 штаммов вакцин RotaTeq® и Rotarix® и ротавирусов, изолированных на территории России после 2010 года (262 последовательности). В выборку вошли последовательности, которые были использованы для филогенетического анализа и описаны в разделе 2.3.

Ранее в работе Aiyegbo с соавторами были описаны два предполагаемых антигенных эпитопа для внутриклеточных антител, расположенных на VP6: А (231-260 а.о.) и В (265-292 а.о.). Было показано, что IgA человека, связываясь внутри клетки с субвирусной двухслойной частицей, блокирует транскрипцию ротавируса [34].

Эпитоп А сформирован 30 аминокислотными остатками. Аминокислотный состав в этом регионе у вакцин Rotarix® и RotaTeq® отличается на одну позицию F248Y (Рисунок 17). Штаммы дикого типа, изолированные на территории России, отличаются от вакцинных вариантов единичными мутациями у отдельных изолятов. В позиции 252 ряд российских образцов (169 из 180 последовательностей), относящихся к первой геногруппе, несет замену V252I. У второй геногруппы в этой позиции находится валин (V), так же как у вакцин Rotarix® и RotaTeq®. Данная аминокислотная мутация не связана с принадлежностью к определенной линии или кластеру на филогенетическом дереве.

Эпитоп В образован 28 аминокислотными остатками. Аминокислотный состав отличается у вакцин Rotarix® и RotaTeq® на одну позицию S291L. В позиции 281 у обеих вакцин находится изолейцин, однако у диких штаммов и первой и второй геногрупп наблюдается замена на валин (у 38 из 180 изолятов генотипа I1 и у 26 из 35 изолятов генотипа I2), которая не связана с филогенетической характеристикой штаммов.

Антигенный эпитоп А 231-260 а.о.																														
	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Rotarix I1	R	F	S	F	P	R	V	I	N	S	A	D	G	A	T	T	W	F	F	N	P	V	I	L	R	P	N	N	V	E
RotaTeq I2	R	F	S	F	P	R	V	I	N	S	A	D	G	A	T	T	W	Y	F	N	P	V	I	L	R	P	N	N	V	E
RUS I1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	I/V	•	•	•	•	•	•	•	•
RUS I2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Y	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Антигенный эпитоп В 265-292 а.о.																													
	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	
Rotarix I1	L	N	G	Q	I	I	N	T	Y	Q	A	R	F	G	T	I	I	A	R	N	F	D	T	I	R	L	L	F	
RotaTeq I2	L	N	G	Q	I	I	N	T	Y	Q	A	R	F	G	T	I	I	A	R	N	F	D	T	I	R	L	S	F	
RUS I1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	I/V	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
RUS I2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	I/V	•	•	•	•	•	•	•	•	•	S	•	

Рисунок 17. Аминокислотный состав антигенных эпитопов А (231-260 а.о.) и В (265-292 а.о.) белка VP6 российских ротавирусов и штаммов в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix®.

После перенесенной ротавирусной инфекции обнаруживают высокие титры антител против протеина VP6. На белке VP6 выявлено несколько В- и Т-клеточных антигенных эпитопов. Исследования антигенных свойств белка VP6 показали, что субгрупповые эпитопы являются конформационными и доступны только на поверхности тримера, но не на мономерной единице VP6 [141]. Установлено, что одиночная аминокислотная мутация в положениях 172 или 305 и 296-299 влияет на связывание антител, специфичных в отношении антител субгруппы I (SGI) [207]. Двойная аминокислотная замена в положении 305-306 и одиночная аминокислотная мутация в положении 315 влияют на связывание антител, распознающих эпитоп субгруппы II (SGII) [207, 299].

На исследуемой выборке штаммов показано наличие аминокислотных различий в позициях M172A, N305A, Q315E, соответствующее принадлежности к первой или второй геногруппе. Участки 296 а.о. и 306 а.о. были консервативны у всех рассмотренных изолятов.

Таким образом, анализ аминокислотного состава в области антигенных эпитопов VP6 показывает их высокую консервативность у вакцинных штаммов и штаммов дикого типа, изолированных на территории России. Высокая консервативность показана у ротавирусов, относящихся к первой и второй геногруппам, которые доминируют среди РВА, изолированных от человека.

3.2 Сравнительный анализ линейных эпитопов вакцинных и российских штаммов РВА дикого типа

Клеточный иммунный ответ играет важную роль в контроле и элиминации вирусной инфекции. Еще в 1995 году было показано, что единичные аминокислотные различия в Т-клеточных эпитопах могут привести к невозможности распознавания эпитопа специфическими Т-клонами [262].

VP7. На белке VP7 ротавируса человека идентифицировано два Т-клеточных эпитопа (16-28 а.о. и 40-52 а.о.) [162, 326]. В нашей работе мы провели сравнительный анализ аминокислотного состава этих регионов у РВА дикого типа, изолированных в России, и штаммов в составе вакцин RotaTeq® и Rotarix® (Рисунок 18).

Всего пять аминокислот в двух рассматриваемых эпитопах были консервативны – 21Y, 23L, 24K (в эпитопе 16-28 а.о.) и 51Q, 52N (в эпитопе 40-52 а.о.). У российских штаммов генотипа G1 в сравнении с вакцинами RV1 и RV5 установлено по две замены в эпитопах 16-28 и 40-52. Большее количество аминокислотных различий показано между штаммом RIX4414 и российскими РВА с генотипами G2, G3, G4 и G9, что объясняется моновалентностью вакцины Rotarix®. Штаммы дикого типа с генотипом G2 содержат 4 и 10 аминокислотных различий с вакциной Rotarix® и, 1 и 3 аминокислотных различия в сравнении с G2 штаммом вакцины RotaTeq® в эпитопах 16-28 а.о. и 40-52 а.о., соответственно.

По три аминокислотных различия в обоих эпитопах показаны между Rotarix® и российскими G3 РВА, и два различия с G3 вакцинным штаммом RotaTeq® в регионе 40-52 а.о. Российские штаммы с генотипом G4 отличались от RV1 на 8 и 7 аминокислот, штамм G4 в составе RV5 на два аминокислотных остатка в эпитопе 16-28.

Ни одна из рассматриваемых вакцин не содержит в составе РВА с генотипом G9. Сравнительный анализ штаммов дикого типа был проведен для штамма с генотипом G1 в составе вакцины Rotarix® и отдельно для каждого из штаммов с генотипами G1, G2, G3 и G4 в составе вакцины RotaTeq®. Российские изоляты G9 отличались от штамма Rotarix® и компонента G1 вакцины RotaTeq® на 3 и 10 аминокислот в регионах 16-28 и 40-52, соответственно. Сравнительный анализ российских ротавирусов и штамма RotaTeq® с генотипом G2 показал по 4 аминокислотных различия в эпитопах 16-28 а.о. и 40-52 а.о. Вакцинные варианты с генотипами G3 и G4 RotaTeq® отличаются от российских штаммов с генотипом G9 на 4 и 7 (регион 16-28) и 6 и 8 (регион 40-52) аминокислот, соответственно.

Штамм	Линейный эпитоп 16-28 а.о.													Линейный эпитоп 40-52 а.о.												
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Rotarix G1	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	S	V	T	R	I	Y	V	A	L	F	A	L	T	R	A	Q	N
RotaTeq G1	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	S	V	T	R	I	T	V	A	L	F	A	L	T	R	A	Q	N
RUS_G1	.	.	.	L/F	R/Q	.	S/F	○	R/K	.	.	.	
Rotarix				●								●		●								●				
RotaTeq				▲								▲		▲								▲				
RotaTeq G2	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	T	I	T	N	V	I	V	L	I	S	P	F	V	R	T	Q	N
RUS_G2	.	○	L	.	○	.	M
Rotarix		●								●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●		
RotaTeq		▲												▲		▲		▲								
RotaTeq G3	V	I	L	L	N	Y	V	L	K	S	L	T	R	I	I	V	I	L	S	P	L	L	N	A	Q	N
RUS_G3	I/V	.	.	.	L/F
Rotarix	●						●				●		●		●		●					●				
RotaTeq																	▲					▲				
RotaTeq G4	F	V	L	V	S	Y	I	L	K	T	M	I	K	V	I	V	V	L	S	V	L	S	N	A	Q	N
RUS_G4	.	.	○	I
Rotarix	●	●		●	●					●	●	●	●	●	●		●		●	●		●	●			
RUS_G9	I	V	L	L	N	Y	I	L	K	S	L	T	S	L	I	V	I	T/A	S	P	F	V	K	T	Q	N
Rotarix		●									●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
RotaTeq_G1		▲									▲		▲	▲	▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
RotaTeq_G2		▲								▲	▲		▲	▲			▲	▲				▲	▲	▲	▲	▲
RotaTeq_G3	▲	▲					▲						▲	▲				▲				▲	▲	▲	▲	▲
RotaTeq_G4	▲			▲	▲					▲	▲	▲	▲	▲			▲	▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲

Рисунок 18. Аминокислотные последовательности линейных эпитопов белка VP7 российских ротавирусов и штаммов в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq®. Цифрами указан порядковый номер аминокислоты. (○) показаны единичные мутации, (▲) показано наличие аминокислотной замены в сравнении со штаммом RotaTeq®, (●) показано наличие замены в сравнении со штаммом Rotarix®

VP6. Т-клеточные эпитопы ранее были установлены в ряде работ [251, 325, 339]. Анализ линейных эпитопов на выборке штаммов, изолированных на территории России, позволил выявить лишь единичные мутации штаммов дикого типа по сравнению с вакцинными. Аминокислотные различия в позициях N305A, Q315E, L342M, A348S коррелируют с принадлежностью к первой и второй геногруппам, соответственно. Только в позиции L291S вакцинный штамм Rotarix® имеет лейцин, тогда как вакцинные штаммы RotaTeq® и российские образцы имеют серин. В целом, эти участки высококонсервативны и точечных мутаций у российских штаммов нами обнаружено не было (Рисунок 19).

NSP4. Антигенный эпитоп на белке NSP4 был установлен в работе Johansen с соавторами в 1999 году [Johansen et al, 1999]. Анализ Т-клеточных эпитопов был проведен на выборке российских штаммов, описанной в разделе 2.3. Т-клеточный линейный эпитоп NSP4 (114-134 а.о.) содержит единичные мутации между RV1, RV5 и штаммами дикого типа, так в позиции 131 у вакцинных штаммов находится гистидин (Рисунок 20). Часть российских штаммов с генотипом E2 имеют замену H131Y, эти штаммы кластеризуются в линию E2-3 (Рисунок 14). Также эта замена единично присутствует у штаммов с генотипом E1. В позиции 133 вакцинный штамм Rotarix® несет 133N (генотип E1), RotaTeq® 133K (генотип E2). Российские ротавирусы с генотипом E1 в позиции 133 содержали N (аспарагин), с генотипом E2 – K (лизин). Штаммы с генотипом E3 не включены в состав вакцин RotaTeq® и Rotarix® и выборка этих штаммов малочисленна для анализа. По имеющимся данным, E3 варианты отличаются от вакцинных только в позиции K133M/V.

Штамм	Последовательность эпитопа (а.о.)								
	341	342	343	344	345	346	347	348	349
Wa	T	L	L	A	N	V	T	A	V
Rotarix (I1)	•	•	•	•	•	•	•	•	•
RotaTeq (I2)	•	M	•	•	•	•	•	S	•
RUS_I1	•	•	•	•	•	•	•	•	•
RUS_I2	•	M	•	•	•	•	•	S	•

Штамм	Последовательность эпитопа (а.о.)																														
	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	
RRV/РВА человека	D	T	I	R	S	L	F	Q	L	M	R	P	P	N	M	T	P	A	V	A	A	L	F	P	N	A	Q	P	F	E	
Rotarix (I1)	•	•	•	•	L	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Q
RotaTeq (I2)	•	•	•	•	L	S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
RUS_I1	•	•	•	•	L	S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Q
RUS_I2	•	•	•	•	L	S	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Рисунок 19. Аминокислотные последовательности линейных эпитопов VP6 вакцинных штаммов Rotarix®, RotaTeq® и РВА дикого типа, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода.

Штамм	Последовательность эпитопа (а.о.)																					
	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	
RRV/РВА человека	D	K	L	T	T	R	E	I	E	Q	V	E	L	L	K	R	I	Y	D	K	L	
Rotarix (E1)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	H	•	N	•	
RotaTeq (E2)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	H	•	•	•	
RUS_E1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	H	•	N	•	
RUS_E2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	H/Y	•	•	•	
RUS_E3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	H	•	M/V	•	

Рисунок 20. Аминокислотные последовательности линейных эпитопов NSP4 вакцинных штаммов Rotarix®, RotaTeq® и штаммов дикого типа РВА, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода

Таким образом, в ходе проведенного анализа линейных эпитопов VP7, VP6 и NSP4 установлены различия между вакцинными и российскими штаммами ротавирусов. Принципиальное отличие заключается в том, что протеины VP6 и NSP4, по сравнению с белком VP7, консервативны в исследуемых областях, даже для PBA разных генотипов. Выявленные аминокислотные различия у VP6 и NSP4, по-видимому, связаны с генотиповой принадлежностью штамма, а не с влиянием иммунологического прессинга. С одной стороны это наблюдение делает VP6 и NSP4 удобными моделями для разработки вакцин, с другой, их значимость в формировании стойкого протективного иммунитета еще до конца не установлена.

Суммируя все вышесказанное в главе 3, можно заключить, что появление и распространение штаммов, несущих новые антигенные характеристики, может способствовать преодолению ротавирусами иммунологического прессинга, создаваемого естественным и искусственным иммунитетом. Постоянный молекулярный мониторинг циркулирующих ротавирусов представляется важным для своевременного выявления популяционных перестроек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ротавирусная инфекция стала контролируемой с убедительными доказательствами эффективности вакцинации для детей в развитых и развивающихся странах, существенно сократив детскую смертность в регионах с низким уровнем дохода. На территории России вакцинация против ротавирусной инфекции проводится по эпидемическим показаниям и в рамках региональных программ иммунизации детей. В настоящее время активно ведется работа по разработке отечественных кандидатов вакцин. Несмотря на активную вакцинную кампанию, проводимую в мире, связь массовой вакцинации с перестройками или антигенными изменениями типовой структуры популяции ротавируса не была показана. Научно-практический интерес представляет мониторинг изменений в генетической и антигенной структуре циркулирующих ротавирусов для осуществления своевременной корректировки антигенного состава применяемых вакцин и разработки новых.

Данная работа посвящена изучению типового разнообразия циркулирующих на территории Нижнего Новгорода ротавирусов, а также сравнительной молекулярно-генетической характеристике штаммов дикого типа и штаммов в составе Rotarix® и RotaTeq®. Исследование проводили с использованием G- и [P]-типирования РВА методом мультиплексной ПЦР, электрофоретипирования РНК в полиакриламидном геле, секвенирования кДНК методом Ф. Сэнгера, высокопроизводительного секвенирования, филогенетического и филодинамического анализа на основе Байесовского подхода. Первичную структуру эпитопов вакцинных штаммов и российских ротавирусов дикого типа сравнивали с использованием программ MEGAХ и UGENE. Пространственное расположение аминокислотных различий в антигенных детерминантах оценивали на трехмерной структуре протеинов VP4 и VP7 с использованием программы Chimera.

На первом этапе исследования была дана характеристика спектра G[P]-типов РВА в Нижнем Новгороде в 2016-20 гг. В этот период было исследовано 6100 образцов фекалий, полученных от детей до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острая кишечная инфекция. Ротавирусы были обнаружены в 27,2 % случаев (1661 образец), генотип определен у 1223 штаммов. Структура популяции ротавирусов в изучаемый период времени была представлена 14-ю G[P]-типами: G1P[8] (7,1 %), **G2P[4] (22,5 %)**, G3P[8] (2,6 %), G4P[8] (10,4), **G9P[8] (47,4 %)**, G12P[8], G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G4P[6], G3P[4]. При этом антигены 3-х G-типов (9, 12, 8) и 3-х [P]-типов (4, 6, 9) в вакцинах RV1 и RV5 не представлены.

В течение двух сезонов 2016-18 гг. частота обнаружения ротавирусов составила в среднем 31,0 %, затем в 2018-19 гг. произошло статистически значимое снижение этого показателя до 21,6 % ($p < 0,001$). На фоне снижения частоты обнаружения ротавирусов был отмечен рост числа штаммов с генотипом G2P[4], доля которых в 2018-19 гг. составила 39,1 %. Анализ миграции сегментов генома в ПААГ штаммов с генотипом G2P[4] позволил установить пять разных электрофоретических типов РНК. Филогенетический анализ показал, что в нижегородской популяции РВА G2P[4] присутствуют два аллеля гена VP7 (G2-IVa-1 и G2-IVa-3) и два аллеля гена VP4 (P[4]-IVa и P[4]-IVb), которые являются убиквитарными для данного генотипа ротавируса. Показано родство штаммов G2P[4], изолированных в период 2018-19 гг., т.е. в период активизации их циркуляции, с нижегородскими штаммами 2016-18 гг. В сезон 2019-20 гг. частота обнаружения РВА незначительно выросла до 25,1 % на фоне снижения доли штаммов с генотипом G2P[4] до 22,3 % ($p < 0,001$). По всей вероятности, рост доли генотипа G2P[4] в типовой структуре популяции РВА носит естественный характер и не связан с вакцинным давлением или завозом высокопатогенных вариантов.

Одним из механизмов ухода вируса от иммунного ответа является антигенный шифт. В нижегородской популяции РВА при ретроспективном

анализе, нами были обнаружены межгрупповые реассортанты, представляющие собой штаммы с генотипом G1P[8] с коротким ЭФ-типом РНК. Близкородственные ротавирусы были описаны в Японии, Австралии, Таиланде и других странах. На территории Нижнего Новгорода эти штаммы циркулировали в 2013-14 гг., но не стали эпидемически значимыми и не получили дальнейшего распространения. Однако в исследуемый период 2016-20 гг. нами установлен рост числа и разнообразия реассортантов между Wa- и DS-1-подобными вариантами ротавируса. В 2016-17 гг. доля реассортантов составила 1,1 %, в сезон 2019-20 гг. выросла до 12,7 % ($p < 0,001$). Идентифицировано 6 вариантов реассортации. Увеличение доли и числа вариантов реассортантных штаммов отражает активные перестройки в популяции ротавируса на фоне снижения активности его циркуляции и может привести к генерации нового эпидемически значимого фенотипа вируса.

С использованием NGS-секвенирования на платформе Illumina установлена полная нуклеотидная последовательность двух нижегородских изолятов ротавируса с генотипами G2P[4] и G4P[8]. В результате анализа филогенетических характеристик на основе полного генома показана аллельная принадлежность для каждого сегмента изученных штаммов: G4-1C/P[8]-3.6/I1-4/R1-A2/C1-A1/M1-A1/A1-B/N1-A/T1-A2/E1-1/H1-A и G2-IVa-3/P[4]-IVb/I2-VII/R2-VII/C2-VIII/M2-V/A2-II/N2-II/T2-IV/E2-XII/H2-III. С помощью модели нестрогих логнормальных молекулярных часов установлена скорость мутаций для каждого сегмента генома, которая составила: $4.5E-4 - 2.8E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для штамма G4P[8] и $7.51E-4 - 1.81E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год для PVA с генотипом G2P[4].

Показано, что для штамма с генотипом G4P[8] наиболее вероятные географические локации циркуляции ближайшего общего предка были: Россия (VP7, VP4, VP6), Китай (VP1), Таиланд (VP3), Бельгия (NSP1), Венгрия (VP2, NSP2, NSP3), Италия (NSP4) и Япония (NSP5). Для штамма с генотипом G2P[4]: Индия (VP7, VP4, VP6, NSP1, NSP4), Малави (VP2, NSP2, NSP3), Австралия (VP1), Италия (NSP5) и Бангладеш (VP3). Рассчитана статистически значимая

эпидемическая связь со штаммами из других регионов, позволяющая говорить о полифилетическом происхождении сегментов генома проанализированных ротавирусов. Ближайший общий предок штамма с генотипом G4P[8] циркулировал в 2001-2012 гг. в зависимости от анализируемого гена. Для штамма с генотипом G2P[4] ближайший общий предок в зависимости от сегмента, датируется в диапазоне 2006-2013 гг.

Ротавирусная популяция динамична и имеет потенциал к формированию большого числа ко-циркулирующих вариантов. Вакцинация против ротавирусной инфекции признана наиболее эффективной стратегией для уменьшения тяжелых случаев ротавирусного гастроэнтерита. Многочисленные исследования, проведенные в разных регионах мира, демонстрируют циркуляцию РВА, разных линий и сублиний внутри глобальных генотипов, которые могут иметь различные антигенные свойства. Поэтому, крайне важно идентифицировать генетическое разнообразие штаммов РВА, исследовать антигенные различия между российскими штаммами дикого типа и вакцинными штаммами в довакционный период.

На следующем этапе работы, был проведен сравнительный филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 ротавирусов, изолированных на территории России и вакцинных штаммов. Нами установлено, что нижегородские РВА несут 12 аллелей гена VP7: G1-1 и G1-2c; G2-IVa-1 и G2-IVa-3; G3-3a, G3-3e и G3-1; G4-1c; G6-I; G8; G9-3; G12-3, которые отличаются от вакцинных аллелей гена VP7: G1-3, G2-II, G3-3d, G4-1a, G6-IV (RotaTeq®), G1-2a (Rotarix®). Это может быть объяснено тем фактом, что штаммы в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq® были изолированы более 30 лет назад.

Российские ротавирусы с генотипом P[8] имеют аллели гена VP4 P[8]-3 и P[8]-4, в то время как в состав вакцин RotaTeq® и Rotarix® входят штаммы ротавирусов, несущие аллели P[8]-2 и P[8]-1, соответственно. Также было установлено, что нижегородские ротавирусы с генотипом P[4], не

представленные в вакцинах Rotarix® и RotaTeq®, относятся к линиям P[4]-IVa, P[4]-IVb.

Научно-практический интерес представлял анализ филогенетических характеристик российских штаммов РВА на основе гена VP6, с целью оценки его эволюционной динамики. Выборка нуклеотидных последовательностей гена VP6 включала вакцинные штаммы RotaTeq® и Rotarix®, а также 262 последовательности ротавирусов, изолированных на территории России и доступные в международной базе данных GenBank. В ходе анализа показана циркуляция на территории России ротавирусов двух генотипов (I1 и I2) гена VP6. Внутри каждого генотипа достоверно выделены три линии. Большинство российских РВА принадлежат линиям I1-1, I2-1, I2-3. Вакцинные штаммы Rotarix® и RotaTeq® кластеризовались в группы I1-2 и I2-2, соответственно. Установлено, что скорость накопления мутаций у генотипа I2 ($1,008E-3$ нуклеотидов на сайт в год), немного выше, чем у генотипа I1 ($7,732E-4$ нуклеотидов на сайт в год). Кроме этого, для каждой сублинии установлена дата циркуляции ближайшего общего предка, которая, в зависимости от аллеля, варьировала от 1910 года до 1992 года. С использованием непараметрической коалесцентной модели SkyGrid рассчитан эффективный размер популяции, демонстрирующий ее стабильное генетическое разнообразие до 2000-х годов, после чего стала наблюдаться тенденция к снижению для обоих рассматриваемых генотипов. Все вышесказанное позволяет сделать заключение об устойчивости генетических показателей VP6, что свидетельствует о его консервативности.

Для изучения разнообразия аллелей гена NSP4 современных российских штаммов РВА и их взаимоотношения с вакцинными штаммами, была изучена выборка, в которую вошли 89 нуклеотидных последовательностей российских РВА, из которых 45 были изолированы на территории Нижнего Новгорода в период 1992-2016 гг. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, выполненный с применением Байесовского подхода, позволил достоверно выделить три аллеля генотипа E1 (E1-1 – E1-3) и пять

аллелей генотипа E2 (E2-1 – E2-5). Вакцинный штамм Rotarix® принадлежит линии E1-1, как и часть изолятов, выделенных на территории России в 1992-2016 гг., однако кластеризуется отдельно от них. Аллель E1-2 несут нижегородские штаммы и ротавирусы, изолированные на территории Омска и Новосибирска. К аллелю E1-3 относятся штаммы с генотипом G4P[9], изолированные в Нижнем Новгороде, а также на территориях Ганы, Чешской республики, Китая как от людей, так и от свиней. Штаммы в составе вакцины RotaTeq® вошли в кластер E2-5, тогда как российские штаммы распределились по линиям E2-1 – E2-4. Впервые на территории России установлена циркуляция штаммов ротавируса с генотипом E3.

Таким образом, филогенетический анализ штаммов на основе нуклеотидных последовательностей генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 российских ротавирусов и штаммов в составе вакцин Rotarix® и RotaTeq® показал, что штаммы дикого типа кластеризуются отдельно от вакцинных.

Кроме антигенного шифта, который является эффективным инструментом эволюции вирусов с сегментированным геномом, антигенный дрейф позволяет вирусам накапливать точечные мутации, тем самым избегать иммунного ответа и искать новые патогенные варианты. В нашем исследовании был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей российских штаммов дикого типа и вакцинных штаммов в области В- и Т-клеточных эпитопов, что до настоящего времени не проводилось.

В области нейтрализующих эпитопов белка VP7, между российскими штаммами с генотипом G1 и штаммами в составе вакцин RV5 и RV1 показано 5 и 3 аминокислотных различий, соответственно. В сайтах антигенной нейтрализации было установлено следующее количество различий вакцинных штаммов в составе RotaTeq® с российскими штаммами: G2 (4 различия), G3 (4 различия), G4 (4 различия). Сравнительный анализ аминокислотного состава в области сайтов антигенной нейтрализации отдельных компонентов вакцины RotaTeq® и штаммов РВА с генотипом G9, изолированных в России, показал наличие 14 различий с вакцинным штаммом G1 RotaTeq®, 19 с G2 штаммом и

по 11 различий с компонентами VP7 генотипов G3 и G4. В регионах антигенной нейтрализации, количество аминокислотных различий между современными российскими штаммами ротавирусов и моновалентной вакциной Rotarix® различалось в зависимости от генотипа штамма и составило: G2 (13 замен), G3 (13 замен), G4 (16 замен) и G9 (13 замен).

В области нейтрализующих эпитопов белка VP4, российские штаммы с генотипом P[8] отличаются от вакцинного штамма Rotarix® на четыре аминокислоты, от штамма в составе RotaTeq® на 6 аминокислот. Ротавирусы дикого типа с генотипом P[4] отличаются от вакцинного штамма RV1 на 12 а.о., от вакцинного штамма в составе RotaTeq® на 10 а.о.

В 2013 году Aiyegbo с соавторами было установлено, что двухкапсидная частица ротавириона может быть нейтрализована внутриклеточными антителами к белку VP6. В двух предполагаемых эпитопах обнаружены различия в позиции F248Y и L291S у штаммов I1 и I2 как вакцинных, так и штаммов дикого типа. В эпитопе А, образованному 30 аминокислотами, у российских штаммов первой геногруппы, была показана только одна замена V252I в сравнении с вакцинными штаммами, которая не коррелировала с субтиповой принадлежностью. В эпитопе В, образованном 28 аминокислотными остатками, у ряда российских штаммов I1 и I2 в позиции 281 установлена замена I281V, которая также не связана с филогенетической характеристикой штаммов.

По литературным данным, на белке VP7 установлено два Т-клеточных эпитопа: 16-28 а.о. и 40-52 а.о. Количество аминокислотных различий у пятивалентной вакцины RotaTeq® меньше, чем у моновалентной Rotarix®. Российские РВА с генотипом G1 в области линейных эпитопов отличались от вакцинных на 4 а.о. Вакцинный штамм Rotarix отличался от российских РВА на: 14 а.о. (генотип G2), 6 а.о. (генотип G3), 15 а.о. (генотип G4), 13 а.о. (генотип G9). Штаммы в составе вакцины RotaTeq® отличилась на 4 а.о. (генотип G2), 2 а.о. (генотип G3), 1 а.о. (генотип G4), 8-15 а.о. (генотип G9).

Анализ трех Т-клеточных эпитопов белка VP6 (341-349 а.о., 286-306 а.о., 301-315 а.о.) позволил установить аминокислотные различия между штаммами

первой и второй геногруппы: N305A, Q315E, L342M, A348S. Все три эпитопа были высококонсервативны не содержали точечных мутаций. Анализ линейного эпитопа NSP4 (114-134 а.о.) у вакцинных и российских штаммов РВА показал наличие единичных мутаций у отдельных штаммов. Замена H131Y коррелировала с принадлежностью линии E2-3.

С антигенами наружного капсида ротавириона VP4 и VP7 связываются протективные типоспецифические антитела, что дает селективные преимущества и позволяет эффективнее распространяться новым G[P]-вариантам. Высокий уровень консервативности антигенных эпитопов VP6 и NSP4 позволяет объяснить эффект гетеротипического влияния вакцинации на снижение уровня тяжелых диарей.

В настоящей работе охарактеризовано генотиповое разнообразие ротавирусов, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2016-20 гг., определена субгенотиповая принадлежность доминирующих штаммов с генотипом G2P[4], установлена циркуляция двойных межгеногрупповых реассортантов и показано увеличение их доли в 2019-20 гг., дана филогеографическая характеристика штаммов ротавирусов с генотипами G2P[4] и G4P[8] на основе полногеномного анализа, свидетельствующая об их полифилетическом происхождении. На основе филодинамического анализа продемонстрирована долговременная стабильность и консервативность гена VP6 ротавирусов, изолированных на территории России. Установлено, что российские ротавирусы и штаммы в составе вакцин RotaTeq и Rotarix несут разные аллели генов VP7, VP4, VP6 и NSP4 и характеризуются наличием аминокислотных замен в области В- и Т-клеточных эпитопов белков VP7 и VP4 и их консервативностью у белков VP6 и NSP4.

ВЫВОДЫ

1. С использованием методики мультиплексной ПЦР дана характеристика генотипового разнообразия ротавирусов на территории Нижнего Новгорода в ранее не охарактеризованный период 2016-2020 гг. Установлена циркуляция РВА 14 G[P]-типов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[8], G9P[4], G3P[9], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[4], G4P[6].

2. В период 2018-2019 гг. установлена активизация циркуляции штаммов с генотипом G2P[4]. Показано, что нижегородские штаммы G2P[4] несут убиквитарные аллели G2-IVa-1 и G2-IVa-3 гена VP7 и P[4]-IVa и P[4]-IVb гена VP4, родственные штаммам, изолированным на территории Нижнего Новгорода ранее.

3. Впервые показана циркуляция на территории России (Нижний Новгород) ротавирусов с генотипом G1P[8]-I2-E2, которые являются двойными межгрупповыми Wa- и DS-1 реассортантами. Установлено их родство со штаммами из Японии и Таиланда. В период 2019-20 гг. показано увеличение доли реассортантных штаммов до 12,7 %.

4. Методом высокопроизводительного секвенирования определен генотип всех сегментов генома двух штаммов РВА: G4-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-T1 и G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-T2. Дана их филогеографическая характеристика, установлено полифилетическое происхождение.

5. Показано, что российские ротавирусы и штаммы вакцин RotaTeq® и Rotarix® по генам VP7, VP4, VP6 и NSP4, кодирующих основные протективные антигены, относятся к разным филогенетическим линиям.

6. В структуре конформационных эпитопов VP4 и VP7 российских ротавирусов с генотипами G1, G2, G3, G4 и G9 выявлено меньшее количество аминокислотных замен в сравнении с вакциной RotaTeq®, что достигалось за счет ее многокомпонентности, чем в сравнении с Rotarix®. Установлена консервативность в области линейных эпитопов вакцинных и нижегородских штаммов белка VP6 с генотипами I1 и I2, белка NSP4 с генотипами E1, E2, E3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

ВПЧ – вирусоподобные частицы

ДСН – додецилсульфат натрия

кДНК – ДНК, комплементарная РНК

н.о. – нуклеотидное основание

ОГЭ – острый гастроэнтерит

ОКИ – острая кишечная инфекция

ОТ – обратная транскрипция

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РВ – ротавирус

РВА – ротавирус вида А

РВВ – ротавирус вида В

РВС – ротавирус вида С

РВИ – ротавирусная инфекция

РВГЭ – ротавирусный гастроэнтерит

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

МСС – Maximum clade credibility tree – дерево с наибольшей надежностью топологии кладов

tMRCA – время циркуляции ближайшего общего предка

RV1 – моновалентная вакцина Rotarix

RV5 – пентавалентная вакцина RotaTeq

RRV – ротавирус

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимкин, В.Г. Эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг ротавирусной инфекции в Оренбургском регионе в предвакцинальный период / В.Г. Акимкин, А.Т. Подколзин, Н.Б. Денисюк, А.В. Горелов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 2. – С. 30-36.
2. Алексеев, К.П. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики / К.П. Алексеев, С.Л. Кальнов, Т.В. Гребенникова, Т.И. Алипер // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 154-159.
3. Баранов, А.А. Ротавирусная инфекция у детей — нерешенная проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике / А. А. Баранов, Л. С. Намазова-Баранова, В. К. Таточенко, Е. А. Вишнёва, М. В. Федосеенко, Л. Р. Селимзянова, Ю. В. Лобзин, С. М. Харит, М. К. Бехтерева, Н. И. Брико, А. Я. Миндлина, В. В. Кудрявцев, А. В. Горелов, А. Т. Подколзин, М. П. Костинов // Педиатрическая фармакология. – 2017. – Т. 14, № 4. – С. 248–257.
4. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М : Практика, 1998. – 459 с.
5. Горбунов, С.Г., Мазанкова Л.Н., Оськин А.Н. Ротавирусная инфекция и иммунитет: дискуссионные вопросы клинико-иммунологических исследований / С.Г. Горбунов, Л.Н. Мазанкова, А.Н. Оськин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 28-33.
6. Денисюк, Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016-2017 гг / Н.Б. Денисюк // Детские инфекции. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 42-45.
7. Духовлинов, И.В. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А.

Федорова, А.С. Симбирцев // Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18, № 5. – С. 417-424.

8. Епифанова, Н.В. Анализ электрофоретических типов РНК ротавирусов человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Епифанова Наталия Владимировна. – М., 1997. – 20 с.

9. Епифанова, Н.В. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011-12 годах / Н.В. Епифанова, О.В. Морозова, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // Медицинский алфавит. – 2013. – Т. 4, № 24. – С. 20-26.

10. Епифанова, Н.В. Острые кишечные инфекции вирусной этиологии по данным многолетних наблюдений на территории Нижнего Новгорода / Н.В. Епифанова, Т.А. Сашина, Н.М. Хохлова, А.Ю. Кашников, Н.А. Новикова // Медицинский алфавит. – Т.1., № 6. – 2016. – С. 30-34.

11. Жираковская, Е.В. Генетическое разнообразие изолятов ротавируса группы А, выявленных в западной Сибири в 2007-2011 гг / Е.В. Жираковская, Р.Х. Аксанова, М.Г. Горбунова, А.Ю. Тикунов, А.М. Курильщикова, С.Н. Соколов, С.В. Нетесов, Н.В. Тикунова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – № 4. – С. 33-41.

12. Кожухметова, Т.А. Оценка эпидемиологических эффектов применения пятивалентной ротавирусной вакцины при низком уровне охвата вакцинацией целевой когорты / Т.А. Кожухметова, К.В. Кулешов, Д.Х. Кясова, Т.А. Коновалова, Н.В. Паркина, А.Т. Подколзин // Журнал инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 3. – С. 71-76.

13. Кондакова, О.А. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки / Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. // Вестник московского университета. – 2017. – Т.72, № 4. – С. 199-208.

14. Костинов, М.П. Вакцина против ротавирусной инфекции как кандидат для включения в Национальный календарь профилактических

прививок / М.П. Костинов, А.М. Костинов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т.7, № 2. – С. 78-83.

15. Мартынова, Г.П. Ротавирусная инфекция у детей в Красноярском крае: первые шаги к снижению заболеваемости / Г.П. Мартынова, А.Г. Южакова, И.А. Соловьева, А.П. Третьяков // Фарматека. – 2016. – № 11. – С. 45-50.

16. Новикова, Н.А. Электрофоретипирование ротавирусов при клинико-эпидемиологическом изучении инфекции / Н.А. Новикова, Н.В. Епифанова, Е.Е. Альтова, В.Н. Душкин, К.В. Пудова, К.Л. Медведев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1992. – Т. 69, № 2. – С. 31-34.

17. Новикова, Н.А. Цикличность эпидемического процесса ротавирусного гастроэнтерита и ее причины / Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Федорова О.Ф. // Материалы научной конференции: новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. – 2004. – Т. 1. – С. 74-77.

18. Новикова, Н.А. Анализ нуклеотидных последовательностей гена NSP4 ротавирусов группы А, изолированных в Нижнем Новгороде / Н.А. Новикова, Н.В. Пономарева, Д.В. Новиков, А.Г. Прилипов, Н.В. Епифанова, Л.Н. Голицына // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53, №6. – С. 35-39.

19. Рудакова, А.В. Оценка предотвращения затрат на терапию ротавирусной инфекции при вакцинации 5-валентной вакциной в Российской Федерации / А.В. Рудакова, С.М. Харит, А.Н. Усков, Ю.В. Лобзин // Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 2, № 6. – С. 71-75.

20. Рудакова, А.В. Оценка эффективности затрат на вакцинацию детей 5-валентной вакциной против ротавирусной инфекции в Российской Федерации / А.В. Рудакова, С.М. Харит, А.Т. Подколзин, А.Н. Усков, Ю.В. Лобзин // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 14, № 6. – С. 501-507.

21. Рычкова, О.А. Профилактика ротавирусной инфекции: путь расширения региональной программы вакцинации Тюменской области / О.А. Рычкова, Н.В. Казакевич, О.А. Дубинина, Г.В. Шарухо, М.А. Курбатская, Г.Н.

Иванова, А.Т. Подколзин, С.Н. Суглобова, Н.П. Сенникова, Т.П. Лылова, М.П. Куличенко // Фарматека. – 2016. – № 11. – С. 106-111.

22. Рычкова, О.А. Ротавирусная инфекция возможности своевременной вакцинопрофилактики / О.А. Рычкова, М.А. Грахова, А.С. Сагитова, Л.А. Кожевникова, О.В. Старостина, К.П. Кузьмичева // Медицинский совет. – 2018. – № 17. – С. 215-219.

23. Сашина Т.А. Молекулярная характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Нижнем Новгороде: дисс. ...канд. биол. наук: 03.02.02 / Сашина Татьяна Александровна. – М., 2018. – 166с.

24. Смирнова, С.С. Опыт вакцинации против ротавирусной инфекции в Свердловской области / С.С. Смирнова, А.А. Голубкова, С.В. Колтунов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 68-73.

25. Феликсова, Л.В. Результаты массовой иммунизации против протавирусной инфекции детей первого года жизни на отдельной территории Московской области / Л.В. Феликсова, Р.Ф. Шаповалова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 75-81.

26. Харит, С.М. Оценка бремени ротавирусных гастроэнтеритов как обоснование необходимости плановой вакцинации / С.М. Харит, М.К. Бехтерева, Ю.В. Лобзин, А.В. Рудакова, А.Т. Подколзин, Н.В. Тикунов // Медицинский совет. – 2017. – № 4. – С. 73-78.

27. Южакова, А.Г. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции: социальная значимость и эффективность / А.Г. Южакова, Г.П. Мартынова // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 65-71.

28. Abdel-Moneim, A.S. Sequence Diversity of VP4 and VP7 Genes of Human Rotavirus Strains in Saudi Arabia / A.S. Abdel-Moneim, M.I. Al-Malky, A.A. Alsulaimani, A.S. Abuelsaad, I. Mohamed, A.K. Ismail // Foodborne Pathog. Dis. – 2015. – V. 12, N 12. – P. 937-944.

29. Afchangi, A. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate / A. Afchangi, S. Jalilvand, N. Mohajel, S.M. Marashi, Z. Shoja // Rev Med Virol. – 2019. – V. 29, N2. – P. 2027.

30. Affranchino, J.L. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6 / J.L. Affranchino, S.A. González // *J Gen Virol.* – 1997. – V. 78. – P. 1949-1955.
31. Afrad, M.H. Differences in lineage replacement dynamics of G1 and G2 rotavirus strains versus G9 strain over a period of 22 years in Bangladesh / M.H. Afrad, J. Matthijnssens, S.F. Afroz, P. Rudra, L. Nahar, R. Rahman, M.E. Hossain, S.R. Rahman, T. Azim, M. Rahman // *Infect Genet Evol.* – 2014. – V. 28. – P. 214-222.
32. Agbemabiese, C.A. Genomic constellation and evolution of Ghanaian G2P[4] rotavirus strains from a global perspective / C.A. Agbemabiese, T. Nakagomi, Y.H. Doan, L.P. Do, S. Damanka, G.E. Armah, O. Nakagomi // *Infect Genet Evol.* – 2016. – V. 45. – P. 122-131.
33. Agnello, D. Intrarectal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles induces an antirotavirus immune response localized in the intestinal mucosa and protects against rotavirus infection in mice / D. Agnello, C.A. Hervé, A. Lavaux, M. Darniot, P. Guillon, A. Charpilienne, P. Pothier // *J Virol.* – 2006. V. – 80, N 8. – P. 3823-3832.
34. Aiyegbo, M.S. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore / M.S. Aiyegbo, G. Sapparapu, B.W. Spiller, I.M. Eli, D.R. Williams, R. Kim, D.E. Lee, T. Liu, S. Li, V.L. Woods, D.P. Nannemann, J. Meiler, P.L. Stewart, J.E. Crowe // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 9, N 8. – P. 1-15.
35. Almalki, S.S.R. Circulating rotavirus G and P strains post rotavirus vaccination in Eastern Mediterranean Region / S.S.R. Almalki // *Saudi Med J.* – 2018. – V.39, N 8. – P. 755-766.
36. Andersson, M. Rotavirus genotype shifts among Swedish children and adults-application of a real-time PCR genotyping / M. Andersson, M. Lindh // *J Clin Virol.* – 2017. – V. 96. – P. 1-6.

37. Angel, J. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations / J. Angel, M.A. Franco, H.B. Greenberg // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 5. – P. 529–539.
38. Antunes, H. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population / H. Antunes, A. Afonso, M. Iturriza, I. Martinho, C. Ribeiro, S. Rocha, C. Magalhães, L. Carvalho, F. Branca, J. Gray // *J Clin Virol.* – 2009. – V. 45, N. 1. – P. 76-78.
39. Aoki, S.T. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab / S.T. Aoki, E.C. Settembre, S.D. Trask, H.B. Greenberg, S.C. Harrison, P.R. Dormitzer // *Science.* – 2009. – V. 12, N 324. – P. 1444-1447.
40. Arana, A. Molecular epidemiology of G12 rotavirus strains during eight consecutive epidemic seasons in the Basque Country (North of Spain), 2010-2018 / A. Arana, K.C. Jere, C. Chaguza, M. Montes, M. Alkorta, M. Iturriza-Gomara, G. Cilla // *Infect Genet Evol.* – 2019. – V. 71. – P. 67-75.
41. Arias, C.F. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections / C.F. Arias, S. López, J.D. Mascarenhas, P. Romero, P. Cano, Y.B. Gabbay, R.B. de Freitas, A.C. Linhares // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 1994. V. 1, N 1. – P. 89-94.
42. Arista, S. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population / S. Arista, G.M. Giammanco, S. De Grazia, S. Ramirez, C. Lo Biundo, C. Colomba, A. Cascio, V. Martella // *J. Virol.* – 2006. – V. 80, N 21. – P. 10724–10733.
43. Assis, A.S. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction / A.S. Assis, D.A. Valle, G.R. Antunes, S.H. Tibiriça, R.M. Assis, J.P. Leite, I.P. Carvalho, M.L. Rosa e Silva // *J. Pediatr. Rio. J.* – 2013. – V. 89, N 5. – P. 470–476.
44. Ayala-Breton, C. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference / C. Ayala-Breton, M. Arias, R. Espinosa, P. Romero, C.F. Arias, S. López // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – P. 8819–8831.

45. Azevedo, M.P. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease / M.P. Azevedo, A.N. Vlasova, L.J. Saif // *Expert Rev Vaccines*. – 2013. V. 12, N 2. – P. 169-181.
46. Badaracco, A. Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds / A. Badaracco, L. Garaicoechea, J. Matthijnsens, E. Louge Uriarte, A. Odeón, G. Bilbao, F. Fernandez, G.I. Parra, V. Parreño // *Infect Genet Evol*. – 2013. – V. 18. – P. 18-30.
47. Ball, J.M. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin / J.M. Ball, D.M. Mitchell, T.F. Gibbons, R.D. Parr // *Viral Immunol*. – 2005. – V. 18. P. – 27–40.
48. Banerjee, A. Upsurge and spread of G3 rotaviruses in Eastern India (2014-2016): Full genome analyses reveals heterogeneity within Wa-like genomic constellation / A. Banerjee, M. Lo, P. Indwar, A.K. Deb, S. Das, B. Manna, S. Dutta, U.K. Bhadra, M. Bhattacharya, K. Okamoto, M. Chawla-Sarkar // *Infect Genet Evol*. – 2018. – V. 63. – P. 158-174.
49. Banerjee, I. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India / I. Banerjee, S. Ramani, B. Primrose, M. Iturriza-Gomara, J.J. Gray, D.W. Brown, G. Kang // *J Med Virol*. – 2007. V. 79, N 9. – P. 1413-1421.
50. Bányai, K. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003–2006, Hungary / K. Bányai, A. Bogdán, G. Domonkos, P. Kisfali, P. Molnár, A. Tóth, B. Melegh, V. Martella, J.R. Gentsch, G. Szucs // *J. Med. Virol*. – 2009. – V. 81, N 2, – P. 362–370.
51. Bányai, K. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a Hungarian study / K. Bányai, J.R. Gentsch, V. Martella, A. Bogdán, V. Havasi, P. Kisfali, A. Szabó, I. Mihály, P. Molnár, B. Melegh, G. Szücs // *J. Infect. Dis*. – 2009. – V. 1, N 200 (Suppl 1). – P. S222–S227.
52. Bányai, K. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs / K. Bányai, B. László, J. Duque, A.D. Steele,

E.A. Nelson, J.R. Gentsch, U.D. Parashar // *Vaccine*. – 2012. – V. 27, N 30. – P. 122-130.

53. Bányai K. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia / K. Bányai, G. Kemenesi, I. Budinski, F. Földes, B. Zana, S. Marton, R. Varga-Kugler, M. Oldal, K. Kurucz, F. Jakab // *Infect. Genet. Evol.* – 2017. – V. 48. – P. 19-26.

54. Barro, M. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3 / M. Barro, J.T. Patton // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – V. 102. – P. 4114–4119.

55. Bar-Zeev, N. Impact of monovalent rotavirus vaccine on diarrhoea-associated post-neonatal infant mortality in rural communities in Malawi: a population-based birth cohort study / N. Bar-Zeev, C. King, T. Phiri, J. Beard, H. Mvula, A.C. Crampin, E. Heinsbroek, S. Lewycka, J.E. Tate, U.D. Parashar, A. Costello, C. Mwansambo, R.S. Heyderman, N. French, N.A. Cunliffe, VacSurv Consortium // *Lancet Glob Health*. – 2018. – V. 6, N 9. – P. e1036-e1044.

56. Bedford, T. Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2) / T. Bedford, S. Cobey, P. Beerli, M. Pascual // *PLoS Pathog.* – 2010. V. 6, N 5. – P. 1-9.

57. Bernstein, D.I. Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants / D.I. Bernstein, V.E. Smith, D.S. Sander, K.A. Pax, G.M. Schiff, R.L. Ward // *J Infect Dis*. – 1990. – V. 162, N 5. –P. 1055-1062.

58. Bertolotti-Ciarlet, A. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice / A. Bertolotti-Ciarlet, M. Ciarlet, S.E. Crawford, M.E. Conner, M.K. Estes // *Vaccine*. – 2003. – V. 8, N 21. – P. 3885-3900.

59. Bielejec, F. SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics / F. Bielejec, A. Rambaut, M.A. Suchard, P. Lemey // *Bioinformatics*. – 2011. – V. 27, N 20. – P. 2910-2912.

60. Bines, J.E. Human Neonatal Rotavirus Vaccine (RV3-BB) to Target Rotavirus from Birth / J.E. Bines, J. At Thobari, C.D. Satria, A. Handley, E. Watts, D.

Cowley, H. Nirwati, J. Ackland, J. Standish, F. Justice, G. Byars, K.J. Lee, G.L. Barnes, N.S. Bachtiar, A. Viska Icanervilia, K. Boniface, N. Bogdanovic-Sakran, D. Pavlic, R.F. Bishop, C.D. Kirkwood, J.P. Buttery, Y. Soenarto. // *N Engl J Med.* – 2018. – V. 378, N 8. – P. 719-730.

61. Bishop, R.F. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis / R.F. Bishop, G.P. Davidson, I.H. Holmes, B.J. Ruck // *Lancet.* – 1973. – V. 8, N 2. – P. 1281-1283.

62. Bishop, R.F. The aetiology of diarrhoea in newborn infants / R.F. Bishop, D.J. Cameron, G.L. Barnes, I.H. Holmes, B.J. Ruck // *Ciba Found Symp.* – 1976. – V. 42. – P. 223-236.

63. Bishop, R.F. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection, a prospective longitudinal study in young children / R.F. Bishop, G.L. Barnes, E. Cipriani, J.S. Lund // *N. Engl. J. Med.* – 1983. – V. 309. – P. 72–76.

64. Bok, K. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina / K. Bok, D.O. Matson, J.A. Gomez // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – V. 40, N 6. – P. 2016-2022.

65. Bowen, M.D. Rotavirus Strain Trends During the Postlicensure Vaccine Era: United States, 2008-2013 / M.D. Bowen, S. Mijatovic-Rustempasic, M.D. Esona, E.N. Teel, R. Gautam, M. Sturgeon, P.H. Azimi, C.J. Baker, D.I. Bernstein, J.A. Boom, J. Chappell, S. Donauer, K.M. Edwards, J.A. Englund, N.B. Halasa, C.J. Harrison, S.H. Johnston, E.J. Klein, M.M. McNeal, M.E. Moffatt, M.A. Rench, L.C. Sahni, R. Selvarangan, M.A. Staat, P.G. Szilagyi, G.A. Weinberg, M.E. Wikswo, U.D. Parashar, D.C. Payne // *J Infect Dis.* – 2016. – V. 214, N 5. – P. 732-738.

66. Braeckman, T. Rotavirus vaccines in Belgium: policy and impact / T. Braeckman, K.V. Herck, M. Raes, A. Vergison, M. Sabbe, P. Van Damme // *Pediatr Infect Dis J.* – 2011. – V. 30, N 1 Suppl. – P. S21-24.

67. Bulut, Y. Molecular Epidemiology of Rotavirus Strains in Under Five Children / Y. Bulut, G. Yenişehirli, R. Durmaz // *Indian J. Pediatr.* – 2018. – V. 85, N 5. – P. 364-368.

68. Burke, R.M. Rotavirus Vaccine is Effective Against Rotavirus Gastroenteritis Resulting in Outpatient Care: Results from the MAAGE Study / R.M. Burke, H.C. Groom, A.L. Naleway, E.M. Katz, B. Salas, C.P. Mattison, J. Donald, L. Tsaknaridis, C. Biggs, M.D. Bowen, J.E. Tate, U.D. Parashar, M. Schmidt, A.J. Hall // *Clin Infect Dis.* – 2020. – V. 23:ciaa466, On-line ahead of print.
69. Burnett, E. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions / E. Burnett, U. Parashar, J. Tate // *Paediatr Drugs.* – 2018. – V. 20, N 3. – P. 223-233.
70. Burnett, E. Global Impact of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Hospitalizations and Deaths Among Children <5 Years Old: 2006-2019 / E. Burnett, U.D. Parashar, J.E. Tate // *J Infect Dis.* – 2020. – V. 222, N 10. – P. 1731-1739.
71. Caddy, S.L. Intracellular neutralisation of rotavirus by VP6-specific IgG / S.L. Caddy, M. Vaysburd, M. Wing, S. Foss, J.T. Andersen, K. O'Connell, K. Mayes, K. Higginson, M. Iturriza-Gómara, U. Desselberger, L.C. James // *PLoS Pathog.* – 2020. – V. 16, N 8. – P. e1008732.
72. Cameron, D.J. Noncultivable viruses and neonatal diarrhea: fifteen-month survey in a newborn special care nursery / D.J. Cameron, R.F. Bishop, A.A. Veenstra, G.L. Barnes // *J Clin Microbiol.* – 1978. V. 8, N 1. – P. 93-98.
73. Carvalho-Costa, F. A. The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix® / F.A. Carvalho-Costa, R. de Assis, A.M. Fialho, I.T. Araújo, M.F. Silva, M.M. Gómez, J.S. Andrade, T.L. Rose, T.M. Fumian, E.M. Volotão, M.P. Miagostovich, J. Leite // *BMC paediatrics.* – 2019. – V. 19, N 1. – P. 42.
74. Cashman, O. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009 / O. Cashman, G. Lennon, R.D. Sleator, E. Power, S. Fanning, H. O'Shea // *Vet. Microbiol.* – 2010. – V. 146. – P. 238–244.
75. Centers for Disease Control and Prevention. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation / CDC // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 1999. V. 48, N 43. – P. 1007.

76. Charpilienne, A. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity / A. Charpilienne, J. Lepault, F. Rey, J. Cohen // *J Virol.* – 2002. – V. 76, N 15. – P. 7822-7831.
77. Chen, D. De novo synthesis of minus strand RNA by the rotavirus RNA polymerase in a cell-free system involves a novel mechanism of initiation / D. Chen, J.T. Patton // *RNA.* – 2000. – V. 6, N 10. – P. 1455–1467.
78. Chen, J.Z. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM / J.Z. Chen, E.C. Settembre, S.T. Aoki, X. Zhang, A.R. Bellamy, P.R. Dormitzer, S.C. Harrison, N. Grigorieff // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2009. – V. 106, N 26. – P. 10644–10648.
79. Chen, S.C. Immunity obtained by gene-gun inoculation of a rotavirus DNA vaccine to the abdominal epidermis or anorectal epithelium / S.C. Chen, E.F. Fynan, H.B. Greenberg, J.E. Herrmann // *Vaccine.* – 1999. – V. 6, N 17. – P. 3171-3176.
80. Chen, S.C. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles / S.C. Chen, D.H. Jones, E.F. Fynan, G.H. Farrar, J.C. Clegg, H.B. Greenberg, J.E. Herrmann // *J Virol.* – 1998. – V. 72, N 7. – P. 5757-5761.
81. Chen, S.C. Protective immunity induced by rotavirus DNA vaccines / S.C. Chen, E.F. Fynan, H.L. Robinson, S. Lu, H.B. Greenberg, J.C. Santoro, J.E. Herrmann // *Vaccine.* – 1997. – V. 15, N 8. – P. 899-902.
82. Chen, X. Understanding the development and perception of global health for more effective student education / X. Chen // *Yale J Biol Med.* – 2014. – V. 87, N 3. – P. 231-240.
83. Choi, A.H. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses / A.H. Choi, M.M. McNeal, M. Basu, J.A. Flint, S.C. Stone, J.D. Clements, J.A. Bean, S.A. Poe, J.L. VanCott, R.L. Ward // *Vaccine.* – 2002. – V. 20, N 27-28. – P. 3310-3321.

84. Chouikha, A. Relationship between electropherotypes and VP7/VP4 genotypes of group A rotaviruses detected between 2000 and 2007 in Tunisian children / A. Chouikha, I. Fodha, M. Ben Hadj Fredj, M. Ardhaoui, N. Teleb, I. Brini, F. Messaadi, M. Mastouri, T. Sfar, M. Hachicha, T. Kammoun, A. Bouaaziz, F. Amri, A. Harbi, M. Zribi, S. Bousnina, A. Khemakhem, N. Boujaafar, A. Trabelsi, A.D. Steele // *Pathol Biol (Paris)*. – 2011. – V. 59, N 3. – P. e43-48.
85. Ciarlet, M. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq / M. Ciarlet, F. Schodel // *Vaccine*. – 2009. – V. 27, N Suppl. 6. – P. 72–81.
86. Clapp, L.L. Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization / L.L. Clapp, J.T. Patton // *Virology*. – 1991. V. 180, N 2. – P. 697-708.
87. Clark, H.F. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season / H.F. Clark, F.E. Borian, L.M. Bell, K. Modesto, V. Gouvea, S.A. Plotkin // *J. Infect. Dis.* – 1988. – V. 158. – P. 570-587.
88. Clark, H.F. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants / H.F. Clark, P.A. Offit, R.W. Ellis, J.J. Eiden, D. Krah, A.R. Shaw, M. Pichichero, J.J. Treanor, F.E. Borian, L.M. Bell, S.A. Plotkin // *J Infect Dis.* – 1996. – V. 174. – P. S73-80.
89. Colomina, J. Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection / J. Colomina, M.T. Gil, P. Codoñer, J. Buesa // *J Med Virol.* – 1998. – V. 56, N1. – P. 58-65.
90. Corthesy, B. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion / B. Corthésy, Y. Benureau, C. Perrier, C. Fourgeux, N. Parez, H. Greenberg, I. Schwartz-Cornil // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – P. 10692–10699.
91. Cowley, D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children / D.

Cowley, C.M. Donato, S. Roczo-Farkas, C.D. Kirkwood // *J. Gen. Virol.* – 2016. – V. 97, N 2. – P. 403-410.

92. Crawford, S.E. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles / S.E. Crawford, M.K. Estes, M. Ciarlet, C. Barone, C.M. O'Neal, J. Cohen, M.E. Conner // *J Virol.* – 1999. – V. 76, N 6. – P. 4813-4822.

93. Cuffia, V.I. Comparison of Antigenic Dominants of VP7 in G9 and G1 Rotavirus Strains Circulating in La Rioja, Argentina, with the Vaccine Strains / V.I. Cuffia, C. Díaz Ariza Mdel, A. Silvera, L.I. Sabini, P.A. Cordoba // *Viral Immunol.* – 2016. – V. 29, N 6. – P. 367-371.

94. Cunliffe, N.A. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999 / N.A. Cunliffe, J.S. Gondwe, S.M. Graham, B.D. Thindwa, W. Dove, R.L. Broadhead, M.E. Molyneux, C.A. Hart // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 836–843.

95. da Silva, M.F. VP8*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade / M.F. da Silva, M.M. Gómez, T.L. Rose, M. Volotão Ede, F.A. Carvalho-Costa, G. Bello, J.P. Leite // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. – V. 16. – P. 200-205.

96. Dang, D.A. Rotavin-M1 Vaccine Trial Group. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children / D.A. Dang, V.T. Nguyen, D.T. Vu, T.H. Nguyen, D.M. Nguyen, W. Yuhuan, J. Baoming, D.H. Nguyen, T.L. Le // *Vaccine.* – 2012. – V. 27, N 30, Suppl. 1. – P. 114-121.

97. Das, B.K. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India / B.K. Das, J.R. Gentsch, H.G. Cicirello, P.A. Woods, A. Gupta, M. Ramachandran, R. Kumar, M.K. Bhan, R.I. Glass // *J Clin Microbiol.* – 1994. – V. 32, N 7. – P. 1820-1822.

98. de Hoog, M.L.A. Report of the 5th European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC) / M.L.A. de Hoog, T. Vesikari, C. Giaquinto, H.I. Huppertz,

F. Martinon-Torres, P. Bruijning-Verhagen // *Hum Vaccin Immunother.* – 2018. – V. 14, N 4. – P. 1027-1034.

99. De Vos, B. Live attenuated human rotavirus vaccine, RIX4414, provides clinical protection in infants against rotavirus strains with and without shared G and P genotypes: integrated analysis of randomized controlled trials / B. De Vos, H.H. Han, A. Bouckennooghe, S. Debrus, P. Gillard, R. Ward, B. Cheuvar // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2009. – V. 28, N 4. – P. 261-266.

100. Degiuseppe, J.I. Genotype distribution of Group A rotavirus in children before and after massive vaccination in Latin America and the Caribbean: Systematic review / J.I. Degiuseppe, J.A. Stupka // *Vaccine.* – 2020. – V. 38, N 4. – P. 733-740.

101. Dennehy, P.H. Effects of vaccine on rotavirus disease in the pediatric population / P.H. Dennehy // *Curr Opin Pediatr.* – 2012. – V. 24, N 1. – P. 76-84.

102. Deo, R.C. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer / R.C. Deo, C.M. Groft, K.R. Rajashankar, S.K. Burley // *Cell.* – 2002. – V. 108. – P. 71–81.

103. Desselberger, U. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination / U. Desselberger, J. Wolleswinkel-van den Bosch, J. Mrukowicz, C. Rodrigo, C. Giaquinto, T. Vesikari // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2006. – V. 25, N Suppl 1. – P. 30–41.

104. Desselberger, U. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection / U. Desselberger, H.I. Huppertz // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 15, N 203. – P. 188-195.

105. Desselberger, U. Rotaviruses / U. Desselberger // *Virus Res.* – 2014. – V. 190. – P. 75-96.

106. Dey, S.K. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh / S.K. Dey, Y. Hayakawa, M. Rahman, R. Islam, M. Mizuguchi, S. Okitsu, H. Ushijima // *Emerg Infect Dis.* – 2009. – V. 15, N 1. – P. 91-94.

107. Dickinson, B.L. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line / B.L. Dickinson, K. Badizadegan, Z.

Wu, J.C. Ahouse, X. Zhu, N.E. Simister, R.S. Blumberg, W.I. Lencer // *J Clin Invest.* – 1999. – V.104. – P. 903–911.

108. Doan, Y.H. The Occurrence of Amino Acid Substitutions D96N and S242N in VP7 of Emergent G2P[4] Rotaviruses in Nepal in 2004-2005: A Global and Evolutionary Perspective / Y.H. Doan, T. Nakagomi, N.A. Cunliffe, B.D. Pandey, J.B. Sherchand, O. Nakagomi // *Arch Virol.* – 2011. – V. 156, N 11. – P. 1969-1978.

109. Doan, Y.H. Repeated Circulation Over 6 Years of Intergenogroup Mono-Reassortant G2P[4] Rotavirus Strains With Genotype N1 of the NSP2 Gene / Y.H. Doan, T. Nakagomi, O. Nakagomi // *Infect Genet Evol.* – 2012. – V. 12, N 6. – P. 1202-1212.

110. Doan, Y.H. Changes in the distribution of lineage constellations of G2P[4] Rotavirus A strains detected in Japan over 32 years (1980-2011) / Y.H. Doan, T. Nakagomi, C.A. Agbemabiese, O. Nakagomi // *Infect Genet Evol.* – 2015. – V. 34. – P. 423-433.

111. Dong, H.J. G2 rotavirus within an emergent VP7 evolutionary lineage circulating in children with acute diarrhea in Guangxi province of China, 2014 / H.J. Dong, Y. Qian, Y. Zhang, L.Q. Zhao, R.N. Zhu, Y. Nong, Z.J. Mo, R.C. Li // *Arch Virol.* – 2016. – V. 161, N 7. – P. 1987-1992.

112. Dormitzer, P.R. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site / P.R. Dormitzer, Z.J. Sun, G. Wagner, S.C. Harrison // *EMBO J.* – 2002. – V. 21, N 5. – P. 885-897.

113. Dudareva-Vizule, S. Impact of rotavirus vaccination in regions with low and moderate vaccine uptake in Germany / S. Dudareva-Vizule, J. Koch, M. An der Heiden, D. Oberle, B. Keller-Stanislawski, O. Wichmann // *Hum Vaccin Immunother.* – 2012. – V. 8, N 10. – P. 1407-1415.

114. Eichwald, C. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation / C. Eichwald, J.F. Rodriguez, O.R. Burrone // *J Gen Virol.* – 2004. – V. 85. – P. 625-634.

115. El-Attar, L. Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease / L. El-Attar,

S.L. Oliver, A. Mackie, A. Charpilienne, D. Poncet, J. Cohen, J.C. Bridger // *Vaccine*. – 2009. – V. 27, N 24. – P. 3201-3208.

116. Esteban, L.E. Antigenicity and immunogenicity of rotavirus VP6 protein expressed on the surface of *Lactococcus lactis* / L.E. Esteban, C.F. Temprana, M.H. Argüelles, G. Glikmann, A.A. Castello // *Biomed Res Int*. – 2013. Epub 298598.

117. Estes, M.K. Rotavirus stability and inactivation / M.K. Estes, D.Y. Graham, E.M. Smith, C.P. Gerba // *J Gen Virol*. – 1979. – V. 43. – P. 403–409.

118. Estes, M.K. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system / M.K. Estes, S.E. Crawford, M.E. Penaranda, B.L. Petrie, J.W. Burns, W.K. Chan, B. Ericson, G.E. Smith, M.D. Summers // *J Virol*. – 1987. – V. 61, N 5. – P. 1488-1494.

119. Estes, M.K. Rotaviruses and their replication / M.K. Estes, D. Knipe, P. Howley // *Fields virology*. – 2001. – P. 1747–1785.

120. Estes, M.K. *Fields Virology*. 6th ed. Rotaviruses. / M.K. Estes, H.B. Greenberg. – Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. – 2013. – P. 1347–1401.

121. Falcone, E. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR / E. Falcone, M. Tarantino, L. Di Trani, P. Cordioli, A. Lavazza, M. Tollis // *J Clin Microbiol*. – 1999. – V. 37, N 12. – P. 3879-3882.

122. Faria, N.R. Phylodynamics of the HIV-1 CRF02_AG clade in Cameroon / N.R. Faria, M.A. Suchard, A. Abecasis, J.D. Sousa, N. Ndembi, I. Bonfim, R.J. Camacho, A.M. Vandamme, P. Lemey // *Infect Genet Evol*. – 2012. – V. 12, N 2. – P. 453-460.

123. Feng, N. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb / N. Feng, J.A. Lawton, J. Gilbert, N. Kuklin, P. Vo, B.V. Prasad, H.B. Greenberg // *J. Clin. Invest*. – 2002. – V. 109. – P. 1203–1213.

124. Fix, A.D. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults / A.D. Fix, C. Harro, M. McNeal, L. Dally, J. Flores, G. Robertson, J.W. Boslego, S. Cryz // *Vaccine*. – 2015. – V. 33, N 31. – P. 3766-3672.

125. Fleming, F.E. Relative roles of GM1 ganglioside, N-acetylneuraminic acids, and $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating rotavirus infection / F.E. Fleming, R. Böhm, V.T. Dang, G. Holloway, T. Haselhorst, P.D. Madge, J. Deveryshetty, X. Yu, H. Blanchard, M. von Itzstein, B.S. Coulson // *J Virol.* – 2014. – V. 88, N 8. – P. 4558-4571.
126. Flewett, T.H. Letter: Virus particles in gastroenteritis / T.H. Flewett, A.S. Bryden, H. Davies // *Lancet.* – 1973. – V. 2, N 7844. – P. 1497.
127. Flores, J. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants / J. Flores, I. Perez-Schael, M. Gonzalez, D. Garcia, M. Perez, N. Daoud, W. Cunto, R.M. Chanock, A.Z. Kapikian // *Lancet.* – 1987. – V. 1. – P. 882-884.
128. Franco, M.A. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice / M.A. Franco, H.B. Greenberg // *J. Virol.* – 1995. – V. 69, N. 12. – P. 7800–7806.
129. Franco, M.A. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines / M.A. Franco, J. Angel, H.B. Greenberg // *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – P. 2718–2731.
130. Fromantin, C. Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response / C. Fromantin, B. Jamot, J. Cohen, L. Piroth, P. Pothier, E. Kohli // *J Virol.* – 2001. – V. 75, N 22. – P. 11010-11016.
131. Fu, C. Effectiveness of the Lanzhou lamb rotavirus vaccine against gastroenteritis among children / C. Fu, Q. He, J. Xu, H. Xie, P. Ding, W. Hu, Z. Dong, X. Liu, M. Wang // *Vaccine.* – 2012. – V. 17, N 31. – P. 154-158.
132. Fujii, Y. Study of Complete Genome Sequences of Rotavirus A Epidemics and Evolution in Japan in 2012-2014 / Y. Fujii, Y.H. Doan, Y. Suzuki, T. Nakagomi, O. Nakagomi, K. Katayama // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10, Epub. – P. 38.
133. Gentsch, J.R. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch, R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das, M.K. Bhan // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – V. 30, N 6. – P. 1365-1373.

134. Gentsch, J.R. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs / J.R. Gentsch, A.R. Laird, B. Bielfelt, D.D. Griffin, K. Banyai, M. Ramachandran, V. Jain, N.A. Cunliffe, O. Nakagomi, C.D. Kirkwood, T.K. Fischer, U.D. Parashar, J.S. Bresee, B. Jiang, R.I. Glass // *J Infect Dis.* – 2005. – V. 1, N 192 Suppl. – P. S146-159.
135. Giammanco, G.M. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by complete genome analyses / G.M. Giammanco, F. Bonura, M. Zeller, E. Heylen, M. Van Ranst, V. Martella, K. Bányai, J. Matthijnsens, S. De Grazia // *J Gen Virol.* – 2014. – V. 95. – P. 91-109.
136. Gill, M.S. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescentbased model for multiple loci / M.S. Gill, P. Lemey, N.R. Faria, A. Rambaut, B. Shapiro, M.A. Suchard // *Mol Biol Evol.* – 2013. – V. 30, N 3. – P. 713–724.
137. Girard, A. Flagellin in fusion with human rotavirus structural proteins exerts an adjuvant effect when delivered with replicating but non-disseminating adenovectors through the intrarectal route / A. Girard, E. Roques, B. Massie, D. Archambault // *Mol Biotechnol.* – 2014. – V. 56, N5. – P. 394-407.
138. Glass, R.I. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India / R.I. Glass, M.K. Bhan, P. Ray, R. Bahl, U.D. Parashar, H.B. Greenberg, C.D. Rao, N. Bhandari, Y. Maldonado, R.L. Ward, D.I. Bernstein, J.R. Gentsch // *J Infect Dis.* – 2005. – V. 192, N Suppl 1. – P. S30-S35.
139. González, S.A. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6 / S.A. González, J.L. Affranchino // *J Gen Virol.* – 1995. – V. 76. – P. 2357-2360.
140. Gorrell, R.J. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children / R.J. Gorrell, R.F. Bishop // *J Med Virol.* – 1999. – V. 57, N 2. – P. 204-211.
141. Gorziglia, M. Comparative sequence analysis of the genomic segment 6 of four rotaviruses each with a different subgroup specificity / M. Gorziglia, Y. Hoshino, K. Nishikawa, W.L. Maloy, R.W. Jones, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock // *J Gen Virol.* – 1988. – V. 69. – P. 1659-1669.

142. Gouvea, V. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea, R.I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H.F. Clark, B. Forrester, Z.Y. Fang // *J Clin Microbiol.* – 1990. – V. 28, N 2. – P. 276-282.
143. Graff, J.W. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1 / J.W. Graff, D.N. Mitzel, C.M. Weisend, M.L. Flenniken, M.E. Hardy // *J Virol.* – 2002. – V. 76. – P. 9545–9550.
144. Greenberg, H.B. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus / H.B. Greenberg, J. Flores, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, R. Jones // *J Gen Virol.* – 1983. – V. 64. – P. 313-320.
145. Grenfell, B. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens / B.T. Grenfell, O.G. Pybus, J.R. Gog, J.L. Wood, J.M. Daly, J.A. Mumford, E.C. Holmes // *Science.* – 2004. – V. 16, N 303. – P. 327-332.
146. Groome, M.J. Safety and immunogenicity of a parenteral trivalent P2-VP8 subunit rotavirus vaccine: a multisite, randomised, double-blind, placebo-controlled trial / M.J. Groome, L. Fairlie, J. Morrison, A. Fix, A. Koen, M. Masenya, L. Jose, S.A. Madhi, N. Page, M. McNeal, L. Dally, I. Cho, M. Power, J. Flores, S. Cryz // *Lancet Infect Dis.* – 2020. – V. 20, N 7. – P. 851-863.
147. Guerra, S.F.S. Emergence of G12P[6] rotavirus strains among hospitalised children with acute gastroenteritis in Belém, Northern Brazil, following introduction of a rotavirus vaccine / S.F.S. Guerra, P.C.M.S. Fecury, D.A.M. Bezerra, P.S. Lobo, E.T. Penha Júnior, E.C. Sousa Júnior, J.D.P. Mascarenhas, L.S. Soares, M.C.A. Justino, A.C. Linhares // *Arch Virol.* – 2019. – V. 164, N 8. – P. 2107-2117.
148. Guntapong, R. Predominant prevalence of human rotaviruses with the G1P[8] and G8P[8] genotypes with a short RNA profile in 2013 and 2014 in Sukhothai and Phetchaboon provinces, Thailand / R. Guntapong, R. Tacharoenmuang, P. Singchai, S. Upachai, K. Sutthiwarakom, S. Komoto, T. Tsuji, P. Tharmaphornpilas, T. Yoshikawa, S. Sangkitporn, K. Taniguchi // *J Med Virol.* – 2017. – V. 89, N 4. – P. 615-620.

149. Gushulak, B.D. Globalization of infectious diseases: the impact of migration / B.D. Gushulak, D.W. MacPherson // *Clin Infect Dis.* – 2004. – V. 38, N12. – P. 1742-1748.
150. Gutierrez, M. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin mediated endocytosis / M. Gutiérrez, P. Isa, C. Sánchez-San Martín, J. Pérez-Vargas, R. Espinosa, C.F. Arias, S. López // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 9161–9169.
151. Hatcher, E.L. Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks / E.L. Hatcher, S.A. Zhdanov, Y. Bao, O. Blinkova, E.P. Nawrocki, Y. Ostapchuck, A.A Schäffer, J.R. Brister // *Nucleic Acids Res.* – 2017. –V. 45. – P. D482-D490.
152. Hemming, M. Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTeq® vaccine / M. Hemming, T. Vesikari // *Infect Genet Evol.* – 2013. – V. 19. – P. 51-58.
153. Henning, K.J. What is syndromic surveillance? / K.J. Henning // *MMWR Suppl.* – 2004. – V. 24. – P. 5-11.
154. Herring, A.J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels / A.J. Herring, N.F. Inglis, C.K. Ojeh, D.R. Snodgrass, J.D. Menzies // *J Clin Microbiol.* – 1982. – V. 16, N 3. – P. 473-477.
155. Herrmann, J.E. DNA vaccines against rotavirus infections / J.E. Herrmann, S.C. Chen, E.F. Fynan, J.C. Santoro, H.B. Greenberg, H.L. Robinson // *Arch Virol Suppl.* – 1996. – V. 12. – P. 207-215.
156. Herrmann, J.E. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination / J.E. Herrmann, S.C. Chen, E.F. Fynan, J.C. Santoro, H.B. Greenberg, S. Wang, H.L. Robinson // *J Infect Dis.* – 1996. – V. 174, Suppl. – P. S93-S97.
157. Herrmann, J.E. Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in

microparticles / J.E. Herrmann, S.C. Chen, D.H. Jones, A. Tinsley-Bown, E.F. Fynan, H.B. Greenberg, G.H. Farrar // *Virology*. – 1999. – V. 259, N 1. – P. 148-153.

158. Heylen, E. Human P[6] Rotaviruses From Sub-Saharan Africa and Southeast Asia Are Closely Related to Those of Human P[4] and P[8] Rotaviruses Circulating Worldwide / E. Heylen, M. Zeller, M. Ciarlet, J. Lawrence, D. Steele, M. Van Ranst, J. Matthijnssens // *J Infect Dis*. – 2016. – V. 214, N 7. – P. 1039-1049.

159. Hill, V. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the Skygrid coalescent model / V. Hill, G. Baele // *Mol. Biol. Evol*. – 2019. – V. 36, N 11. – P. 2620–2628.

160. Hoa-Tran, T.N. Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background / T.N. Hoa-Tran, T. Nakagomi, H.M. Vu, L.P. Do, P. Gauchan, C.A. Agbemabiese, T.T. Nguyen, O. Nakagomi, N.T. Thanh // *Arch Virol*. – 2016. – V. 161, N 2. – P. 479-482.

161. Holmes, E.C. The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013-2016 epidemic / E.C. Holmes, G. Dudas, A. Rambaut, K.G. Andersen // *Nature*. – 2016. – V. 538. – P. 193-200.

162. Honeyman, M.C. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens / M.C. Honeyman, N.L. Stone, B.A. Falk, G. Nepom, L.C. Harrison // *J Immunol*. – 2010. – V. 184, N4. – P. 2204-2210.

163. Hoshino, Y. Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3 / Y. Hoshino, R.W. Jones, J. Ross, S. Honma, N. Santos, J.R. Gentsch, A.Z. Kapikian // *J. Virol*. – 2004. – V. 78, N 14. – P. 7795–7802.

164. Hull, J.J. National Rotavirus Strain Surveillance System. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction / J.J. Hull, E.N. Teel, T.K. Kerin, M.M. Freeman, M.D. Esona, J.R. Gentsch, M.M. Cortese, U.D. Parashar, R.I. Glass, M.D. Bowen, National Rotavirus Strain Surveillance System // *Pediatr. Infect*. – 2011. – V. 30. – P. 42–47.

165. Hyser, J.M. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity / J.M. Hyser, M.R. Collinson-Pautz, B. Utama, M.K. Estes // *MBio.* – 2010. – V. 1. –P. e00265–10.
166. Ianiro, G. Group A rotavirus surveillance before vaccine introduction in Italy, September 2014 to August 2017 / G. Ianiro, R. Micolano, I. Di Bartolo, G. Scavia, M. Monini; RotaNet-Italy Study Group // *Euro Surveill.* – 2019. – V. 24, N 15. – P. 1800418.
167. Ishida, S. Quantification of systemic and local immune responses to individual rotavirus proteins during rotavirus infection in mice / S. Ishida, N. Feng, B. Tang, J.M. Gilbert, H.B. Greenberg // *J Clin Microbiol.* – 1996. – V. 34, N 7. – P. 1694-1700.
168. Istrate, C. Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-dose regimen induce protective immunity in mice / C. Istrate, J. Hinkula, A. Charpilienne, D. Poncet, J. Cohen, L. Svensson, K. Johansen // *Vaccine.* – 2008. – V. 26, N 35. –P. 4594-4601.
169. Iturriza-Gómara, M. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999 / M. Iturriza-Gómara, B. Isherwood, U. Desselberger, J. Gray // *J Virol.* – 2001. – V. 75, N 8. – P. 3696-3705.
170. Iturriza-Gómara, M. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation / M. Iturriza-Gómara, C. Wong, S. Blome, U. Desselberger, J. Gray // *J Virol.* – 2002. – V. 76, N 13. – P. 6596-6601.
171. Iturriza-Gomara, M. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network / M. Iturriza-Gómara, T. Dallman, K. Bányai, B. Böttiger, J. Buesa, S. Diedrich, L. Fiore, K. Johansen, M. Koopmans, N. Korsun, D. Koukou, A. Kroneman, B. László, M. Lappalainen, L. Maunula, A.M. Marques, J. Matthijnsens, S. Midgley, Z. Mladenova, S. Nawaz, M. Poljsak-Prijatelj, P. Pothier, F.M. Ruggeri, A. Sanchez-Fauquier, A. Steyer, I. Sidaraviciute-Ivaskeviciene, V. Syriopoulou, A.N.

Tran, V. Usonis, M. Van Ranst, A. De Rougemont, J. Gray // *Epidemiol. Infect.* – 2011. – V. 139, N 6. – P. 895–909.

172. Ivashechkin, A.A. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018-2019 / A.A. Ivashechkin, A.G. Yuzhakov, T.V. Grebennikova, K.A. Yuzhakova, N.Y. Kulikova, L.B. Kisteneva, S.V. Smetanina, M.V. Bazarova, M.G. Almazova // *Arch. Virol.* - 2020. - V. 165, N 3. P.691-702.

173. Jayaram, H. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication / H. Jayaram, M.K. Estes, B.V. Prasad // *Virus Res.* – 2004. – V. 101, N 4. – P. 67-81.

174. Jiang, B. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview / B. Jiang, J.R. Gentsch, R.I. Glass // *Clin. Infect. Dis.* – 2002. – V. 34, N10. – P. 1351–1361.

175. Jiang, V. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries / V. Jiang, B. Jiang, J. Tate, U.D. Parashar, M.M. Patel // *Hum Vaccin.* – 2010. – V. 6, N 7. – P. 532-542.

176. Jin, Q. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses / Q. Jin, R.L. Ward, D.R. Knowlton, Y.B. Gabbay, A.C. Linhares, R. Rappaport, P.A. Woods, R.I. Glass, J.R. Gentsch // *Arch. Virol.* – 1996. – V. 141, N 11. – P. 2057-2076.

177. Johansen, K. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus / K. Johansen, J. Hinkula, F. Espinoza, M. Levi, C. Zeng, U. Rudén, T. Vesikari, M. Estes, L. Svensson // *J. Med. Virol.* – 1999. – V. 59, N 3. – P. 369-377.

178. John, T.J. Problems with oral poliovaccine in India / T.J. John // *Indian. Pediatr.* – 1972. – V. 9. – P. 252–256.

179. Kamiya, H. Characterization of an unusual DS-1-Like G8P[8] rotavirus strain from Japan in 2017: evolution of emerging DS-1-Like G8P[8] strains through reassortment / H. Kamiya, R. Tacharoenmuang, T. Ide, M. Negoro, T. Tanaka, K. Asada, H. Nakamura, K. Sugiura, M. Umemoto, H. Kuroki, H. Ito, S. Tanaka, M. Ito, S. Fukuda, R. Hatazawa, Y. Hara, R. Guntapong, T. Murata, K. Taniguchi, S. Suga, T.

Nakano, K. Taniguchi, S. Komoto // *Jpn J Infect Dis.* – 2019. – V. 72, N 4. – P. 256-260.

180. Kapikian, A.Z. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance / A.Z. Kapikian, R.G. Wyatt, M.M. Levine, R.H. Yolken, D.H. VanKirk, R. Dolin, H.B. Greenberg, R.M. Chanock // *J Infect Dis.* – 1983. – V. 147. – P. 95–106.

181. Kapikian, A.Z. Efficacy of quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children / A.Z. Kapikian, Y. Hoshino, R.M. Chanock, I. Perez-Scael // *J. infect. Dis.* – 1996. – V. 174 (suppl.1). – P. S65-S72.

182. Kargar, M. Predominance of rotavirus G8 genotype in hospitalized children with acute gastroenteritis in Yasuj, Iran / M. Kargar, P. Khodadadi, A. Najafi, H. Ansari // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2014. – V. 18, N5. – P. 699-702.

183. Kawai, K. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review / K. Kawai, M.A. O'Brien, M.G. Goveia, T.C. Mast, A.C. El Khoury // *Vaccine.* – 2012. – V. 30, N 7. – P. 1244–1254.

184. Khandoker, N. Molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis in Japan during 2014-2015: Characterization of re-emerging G2P[4] after rotavirus vaccine introduction / N. Khandoker, A. Thongprachum, S. Takanashi, S. Okitsu, S. Nishimura, H. Kikuta, A. Yamamoto, K. Sugita, T. Baba, M. Kobayashi, S. Hayakawa, M. Mizuguchi, H. Ushijima // *J Med Virol.* – 2018. – V. 90, N 6. – P. 1040-1046.

185. Kim, I.S. Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry / I.S. Kim, S.D. Trask, M. Babyonyshev, P.R. Dormitzer, S.C. Harrison // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 6200–6207.

186. Kirkwood, C. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses / C. Kirkwood, P.J. Masendycz, B.S. Coulson // *Virology.* – 1993. – V. 196, N 1. – P. 79-88.

187. Kirkwood, C.D. Australian Rotavirus Surveillance Program: annual report, 2009/2010 / C.D. Kirkwood, K. Boniface, R.F. Bishop, G.L. Barnes // *Commun. Dis. Intell.* – 2010. – V. 34, N 4. – P. 427–434.

188. Kirkwood, C.D. Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia / C.D. Kirkwood, K. Boniface, G.L. Barnes, R.F. Bishop // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – V. 30 (Suppl. 1). – P. 48–53.
189. Komoto, S. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand / S. Komoto, R. Tacharoenmuang, R. Guntapong, T. Ide, K. Haga, K. Katayama, T. Kato, Y. Ouchi, H. Kurahashi, T. Tsuji, S. Sangkitporn, K. Taniguchi // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, N 11. – P. 1-22.
190. Kondo, K. Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014 / K. Kondo, T. Tsugawa, M. Ono, T. Ohara, S. Fujibayashi, Y. Tahara, N. Kubo, S. Nakata, Y. Higashidate, Y. Fujii, K. Katayama, Y. Yoto, H. Tsutsumi // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – V. 23, N 6. – P. 968-972.
191. Kühnert, D. Phylogenetic and epidemic modeling of rapidly evolving infectious diseases / D. Kühnert, C.H. Wu, A.J. Drummond // *Infect Genet Evol.* – 2011. – V. 11, N 8. – P. 1825-1841.
192. Kulkarni, R. Sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G1P[8] rotaviruses circulating among diarrhoeic children in Pune, India: a comparison with Rotarix and RotaTeq vaccine strains / R. Kulkarni, R. Arora, R. Arora, S.D. Chitambar // *Vaccine.* – 2014. – V. 11, N 32, Suppl. 1. – P. 75-83.
193. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Mol Biol Evol.* – 2018. – V. 35, N 6. – P. 1547-1549.
194. Kuzuya, M. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan / M. Kuzuya, R. Fujii, M. Hamano, K. Kida, Y. Mizoguchi, T. Kanadani, K. Nishimura, T. Kishimoto // *J. Med. Virol.* – 2014. – V. 86, N 6. – P. 1056-1064.
195. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227, N 5259. – P. 680-685.

196. Lappalainen, S. Rotavirus vaccination and infection induce VP6-specific IgA responses / S. Lappalainen, V. Blazevic, M. Malm, T. Vesikari // *J Med Virol.* – 2017. – V. 89, N 2. – P. 239-245.
197. Lawton, J.A. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles / J.A. Lawton, M.K. Estes, B.V. Prasad // *Nat. Struct. Biol.* – 1997. – V. 4. – P. 118–121.
198. Lazdins, I. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7 / I. Lazdins, B.S. Coulson, C. Kirkwood, M. Dyall-Smith, P.J. Masendycz, S. Sonza, I.H. Holmes // *Virology.* – 1995. – V. 209, N 1. – P. 80–89.
199. Lee, K. *Globalization and Health* / K. Lee, D. Yach, A. Kamradt-Scott // *Global Public Health: Diseases, Programs, Systems and Policies*, 3 rd ed. New York. – 2011. – P. 885-913.
200. Legrottaglie, R. Isolation and identification of rotaviruses as aetiological agents of neonatal diarrhoea in kids. Electrophoretical characterization by PAGE / R. Legrottaglie, A. Volpe, V. Rizzi, P. Agrimi // *New Microbiol.* – 1993. – V. 16, N 3. – P. 227-35.
201. Lemey, P. HIV evolutionary dynamics within and among hosts / P. Lemey, A. Rambaut, O.G. Pybus // *AIDS Rev.* – 2006. – V. 8. – P. 125–140.
202. Leshem, E. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis / E. Leshem, B. Lopman, R. Glass, J. Gentsch, K. Bányai, U. Parashar, M. Patel // *Lancet Infect Dis.* – 2014. – V. 19, N 4. – P. 847-856.
203. Levine, M.M. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR / M.M. Levine, J.B. Kaper, D. Herrington, J. Ketley, G. Losonsky, C.O. Tacket, B. Tall, S. Cryz // *Lancet.* – 1988. – V. 2. – P. 467–470.
204. Li, Z. Rotavirus architecture at subnanometer resolution / Z. Li, M.L. Baker, W. Jiang, M.K. Estes, B.V. Prasad // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – P. 1754–1766.
205. Li, Y.J. Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production / Y.J. Li,

G.P. Ma, G.W. Li, X.Y. Qiao, J.W. Ge, L.J. Tang, M. Liu, L.W. Liu // *J Biomed Biotechnol.* – 2010. – Epub. – P. 708460.

206. Lobzin, Y.V. Burden of Childhood Rotavirus Disease in the Outpatient Setting of the Russian Federation / Y.V. Lobzin, S.M. Kharit, M.G. Goveia, M.A. O'Brian, A.T. Podkolzin, B.M. Blokhin, M.K. Bekhtereva, A.V. Rudakova, N.V. Tikunova // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2017. – V. 36, N 5. – P. 472-476.

207. López, S. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6 / S. López, R. Espinosa, H.B. Greenberg, C.F. Arias // *Virology.* – 1994. – V. 201, N 1. – P. 153-162.

208. Lucero, Y. Predominance of Rotavirus G8P[8] in a City in Chile, a Country Without Rotavirus Vaccination / Y. Lucero, M. O'Ryan, G. Liparoti, N. Huerta, N. Mamani, S. Ramani, A.J. Lagomarcino, F. Del Canto, J. Quense // *J Pediatr.* – 2019. – V. 204. – P. 298-300.

209. Luchs, A. Outbreak of G2P[4] rotavirus gastroenteritis in a retirement community, Brazil, 2015: An important public health risk? / A. Luchs, G. Madalosso, A. Cilli, S.G. Morillo, S.R. Martins, K.A.F. de Souza, G.M. Namiyama, C.R. Gonçalves, R.C.C. Carmona, M.D.C.S. Timenetsky // *Geriatr Nurs.* – 2017. – V. 38, N 4. – P. 283-290.

210. Ludert, J.E. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation / J.E. Ludert, M.C. Ruiz, C. Hidalgo, F. Liprandi // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – P. 6643–6651.

211. Lukashev, A.N. Phylodynamics of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in South Russia / A.N. Lukashev, A.A. Deviatkin // *Infect Genet Evol.* – 2018. – V. 59. – P. 23-27.

212. Madhi, S.A. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants / S.A. Madhi, N.A. Cunliffe, D. Steele, D. Witte, M. Kirsten, C. Louw, B. Ngwira, J.C. Victor, P.H. Gillard, B. B. Cheuvart, H.H. Han, K.M. Neuzil // *N. Eng. J. Med.* – 2016. – V. 28, N 3. – P. 108-114.

213. Maguire, J.E. Rotavirus Epidemiology and Monovalent Rotavirus Vaccine Effectiveness in Australia: 2010-2017 / J.E. Maguire, K. Glasgow, K. Glass,

S. Roczo-Farkas, J.E. Bines, V. Sheppard, K. Macartney, H.E. Quinn // *Pediatrics*. – 2019. – V. 144, N 4. – P. e20191024.

214. Malakalinga, J.J. Rotavirus Burden, Genetic Diversity and Impact of Vaccine in Children under Five in Tanzania / J.J. Malakalinga, G. Misinzo, G.M. Msalya, R.R. Kazwala // *Pathogens*. – 2019. – V. 8, N 4. – P. 210.

215. Mallery, D.L. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21) / D.L. Mallery, W.A. McEwan, S.R. Bidgood, G.J. Towers, C.M. Johnson, L.C. James // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – V. 107. – P. 19985–19990.

216. Malm, M. Development of T cell immunity to norovirus and rotavirus in children under five years of age / M. Malm, H. Hyöty, M. Knip, T. Vesikari, V. Blazevic // *Sci Rep*. – 2019. – V. 9, N 1. – P. 3199.

217. Manuylov, V.A. Hepatitis C virus subtype 3a was introduced in the USSR in the early 1980s / V.A. Manuylov, E.V. Chub, V.S. Kichatova, N.V. Soboleva, O.V. Isaeva, A.A. Zamyatnin, S.V. Netesov // *J Gen Virol*. – 2017. – 98, N 8. – P. 2079-2087.

218. Marelli, B. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice / B. Marelli, A.R. Perez, C. Banchio, D. de Mendoza, C. Magni // *J Virol Methods*. – 2011. – V. 175, N 1. – P. 28-37.

219. Markkula, J. Continuing rotavirus circulation in children and adults despite high coverage rotavirus vaccination in Finland / J. Markkula, M. Hemming-Harlo, C. Savolainen-Kopra, H. Al-Hello, T. Vesikari // *J Infect*. – 2020. – V. 80, N 1. – P. 76-83.

220. Martella, V. Zoonotic aspects of rotaviruses / V. Martella, K. Bányai, J. Matthijssens, C. Buonavoglia, M. Ciarlet // *Vet Microbiol*. – 2010. – V. 140, N 3-4. – P. 246-255.

221. Mathieu, M. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion / M. Mathieu, I. Petitpas, J. Navaza, J.

Lepault, E. Kohli, P. Pothier, B.V. Prasad, J. Cohen, F.A. Rey // *EMBO J.* – 2001. – V. 20, N 7. – P. 1485-1497.

222. Matthijnssens, J. Full genome-based classification of rotavirus reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains / J. Matthijnssens, M. Ciarlet, E. Heiman, I. Arijs, T. Delbeke, S.M. McDonald, E.A. Palombo, M. Iturriza-Gómara, P. Maes, J.T. Patton, M. Rahman, M. Van Ranst // *J. Virol.* – 2008. – V. 82, N 7. – P. 3204-3219.

223. Matthijnssens, J. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments / J. Matthijnssens, M. Ciarlet, M. Rahman, H. Attoui, K. Bányai, M.K. Estes, J.R. Gentsch, M. Iturriza-Gómara, C.D. Kirkwood, V. Martella, P.P. Mertens, O. Nakagomi, J.T. Patton, F.M. Ruggeri, L.J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, U. Desselberger, M. Van Ranst // *Arch. Virol.* – 2008. – V. 153, N 8. – P. 1621-1629.

224. Matthijnssens, J. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTaq / J. Matthijnssens, D.B. Joelsson, D.J. Warakomski, T. Zhou, P.K. Mathis, M.H. van Maanen, T.S. Ranheim, M. Ciarlet // *Virology.* – 2010. – V. 403, N 2. – P. 111–127.

225. Matthijnssens, J. Phylodynamic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore Their Potential for Swift Global Spread / J. Matthijnssens, E. Heylen, M. Zeller, M. Rahman, P. Lemey, M. Van Ranst // *Mol. Biol. Evol.* – 2010. – V. 27, N 10. – P. 2431–2436.

226. Matthijnssens, J. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens, M. Ciarlet, S.M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J.R. Brister, J. Buesa, M.D. Esona, M.K. Estes, J.R. Gentsch, M. Iturriza-Gómara, R. Johne, C.D. Kirkwood, V. Martella, P.P. Mertens, O. Nakagomi, V. Parreño, M. Rahman, F.M. Ruggeri, L.J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, J.T. Patton, U. Desselberger, M. Van Ranst // *Arch. Virol.* – 2011. – V. 156, N 8. – P. 1397-1413.

227. Matthijnssens, J. VP6 sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation / J. Matthijnssens, P.H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. Van Ranst, R. Johne // *Arch. Virol.* – 2012. – V. 157, N 6. – P. 1177-1182.
228. Mattion, N.M. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11 / N.M. Mattion, D.B. Mitchell, G.W. Both, M.K. Estes // *Virology.* – 1991. – V. 181, N 1. – P. 295-304.
229. McDonald, S.M. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations / S.M. McDonald, J. Matthijnssens, J.K. McAllen, E. Hine, L. Overton, S. Wang, P. Lemey, M. Zeller, M. Van Ranst, D.J. Spiro, J.T. Patton // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5, N 10. – P. 1-14.
230. McDonald, S.M. Rotavirus VP2 core-shell regions critical for viral polymerase activation / S.M. McDonald, J.T. Patton // *Journal of Virology.* – 2011. – V. 85, N7. – P. 3095-3105.
231. McNeal, M.M. Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge / M.M. McNeal, M. Basu, J.A. Bean, J.D. Clements, N.Y. Lycke, A. Ramne, B. Löwenadler, A.H. Choi, R.L. Ward // *Vaccine.* – 2007. – V. 25, N 33. – P. 6224-6231.
232. Mihalov-Kovács, E. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary / E. Mihalov-Kovács, A. Gellért, S. Marton, S.L. Farkas, E. Fehér, M. Oldal, F. Jakab, V. Martella, K. Bányai // *Emerg. Infect. Dis.* – 2015. – V. 21, N 4. – P. 660-663.
233. Mirzayeva, R. Rotavirus burden among children in the newly independent states of the former union of soviet socialist republics: literature review and first-year results from the rotavirus surveillance network / R. Mirzayeva, M.M. Cortese, L. Mosina, R. Biellik, A. Lobanov, L. Chernyshova, M. Lashkarashvili, S. Turkov, M. Iturriza-Gomara, J. Gray, U.D. Parashar, D. Steele, N. Emiroglu; Rotavirus Surveillance Network. // *J. Infect. Dis.* – 2009. – V. 1, N 200 Suppl. – P. 203-214.

234. Monini, M. Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003–2005 / M. Monini, F. Cappuccini, P. Battista, E. Falcone, A. Lavazza, F.M. Ruggeri // *Vet. Microbiol.* – 2008. – V. 129. – P. 384–389.

235. Motamedi-Rad, M. VP7 and VP4 genotypes of rotaviruses cocirculating in Iran, 2015 to 2017: Comparison with cogent sequences of Rotarix and RotaTeq vaccine strains before their use for universal mass vaccination. / M. Motamedi-Rad, M. Farahmand, A. Arashkia, S. Jalilvand, Z. Shoja // *J Med Virol.* – 2020. – V. 92, N 8. – P. 1110-1123.

236. Mouna, B.H. Sequence and phylogenetic analyses of human rotavirus strains: comparison of VP7 and VP8(*) antigenic epitopes between Tunisian and vaccine strains before national rotavirus vaccine introduction / B.H. Mouna, M.B. Hamida-Rebaï, E. Heylen, M. Zeller, A. Moussa, S. Kacem, M. Van Ranst, J. Matthijssens, A. Trabelsi // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. – V.18. – P. 132-144.

237. Moutelíková, R. Emergence of Rare Bovine-Human Reassortant DS-1-Like Rotavirus A Strains with G8P[8] Genotype in Human Patients in the Czech Republic / R. Moutelíková, P. Sauer, M. Dvořáková Heroldová, V. Holá, J. Prodělalová. // *Viruses.* – 2019. – V. 11, N 11. – P. 1015.

238. Nagaoka, Y. Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group a human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000 / Y. Nagaoka, M. Tatsumi, T. Tsugawa, Y. Yoto, H. Tsutsumi // *J Med Virol.* – 2012. – V. 84, N 5. – P. 832-838.

239. Nagashima, S. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus / S. Nagashima, N. Kobayashi, M. Ishino, M.M. Alam, M.U. Ahmed, S.K. Pau, B. Ganesh, M. Chawla-Sarkar, T. Krishnan, T.N. Naik, Y.H. Wang // *J Med Virol.* – 2008. – V. 80, N 11. – P. 2023-2033.

240. Naik, S.P. Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIIL®) / S.P. Naik, J.K. Zade, R.N. Sabale, S.S. Pisal, R. Menon, S.G. Bankar, S. Gairola, R.M. Dhere // *Vaccine.* – 2017. – V. 35, N 22. – P. 2962-2969.

241. Nakagomi, T. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus / T. Nakagomi, O. Nakagomi // *J. Virol.* – 1989. – V. 63. – P. 1431–1434.
242. Nakagomi, T. Full genotype constellations of six feline Rotavirus A strains isolated in Japan in the 1990s including a rare A15 NSP1 genotype / T. Nakagomi, C.A. Agbemabiese, O. Nakagomi // *Arch Virol.* – 2018. – V. 163, N 8. – P. 2257-2260.
243. Niedergang, F. New trends in antigen uptake in the gut mucosa / F. Niedergang, M.N. Kweon // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13 N 10. – P. 485-490.
244. Novikova, N.A. Rotavirus infection in children of Nizhny Novgorod, Russia: the gradual change of the virus allele from P[8]-1 to P[8]-3 in the period 1984-2010 / N.A. Novikova, O.V. Morozova, O.F. Fedorova, N.V. Epifanova, T.A. Sashina, E.I. Efimov // *Arch Virol.* – 2012. – V. 157, N12. – P. 2405-2409.
245. Novikova, N.A. Long-term monitoring of G1P[8] rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984-2019 / N.A. Novikova, T.A. Sashina, N.V. Epifanova, A.U. Kashnikov, O.V. Morozova // *Arch Virol.* – 2020. – V. 165, N 4. –P. 865-875.
246. O’Neal, C.M. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity / C.M. O’Neal, S.E. Crawford, M.K. Estes, M.E. Conner // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – P. 8707–8717.
247. Offit, P.A. Rotavirus-Specific Humoral and Cellular Immune Response after Primary, Symptomatic Infection / P.A. Offit, E.J. Hoffenberg, N. Santos, V. Gouvea // *J Infect Dis.* – 1993. – V. 167. – P. 1436–1440.
248. Ogilvie, I. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness / I. Ogilvie, H. Khoury, A.C. El Khoury, M.M, Goetghebeur // *Hum Vaccin.* – 2011. – V. 7, N5. – P. 523-533.
249. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov; UGENE team. // *Bioinformatics.* – 2012. – V. 28, N 8. – P. 1166-1167.

250. Parashar, U. Progress with rotavirus vaccines summary of the tenth international rotavirus symposium / U. Parashar, D. Steele, K. Neuzil, C.D. Quadros, P. Tharmaphornpilas, F. Serhan, M. Santosham, M. Patel, R. Glass // *Vaccines*. – 2012. – V. 12, N 2. – P. 113-117.

251. Parra, M. Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 / M. Parra, D. Herrera, J.M. Calvo-Calle, L.J. Stern, C.A. Parra-López, E. Butcher, M. Franco, J. Angel // *Virology*. – 2014. – V. 452-453. – P. 191-201.

252. Patel, M. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? / M. Patel, A.L. Shane, U.D. Parashar, B. Jiang, J.R. Gentsch, R.I. Glass // *J. Infect. Dis.* – 2009. – V. 200(Suppl.). – P. 39-48.

253. Payne, D.C. Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 US Counties, 2006–2009 / D.C. Payne, M.A. Staat, K.M. Edwards, P.G. Szilagyi, G.A. Weinberg, C.B. Hall, J. Chappell, A.T. Curns, M. Wikswo, J.E. Tate, B.A. Lopman, U.D. Parashar; New Vaccine Surveillance Network // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – V. 53, N 3. – P. 245–253.

254. Peck, M. Global Routine Vaccination Coverage, 2018 / M. Peck, M. Gacic-Dobo, M.S. Diallo, Y. Nedelec, S.V. Sodha, A.S. Wallace // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2019. – V, 68, N 42. – P. 937-942.

255. Pêra, F.F. Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana* / F.F. Pêra, D.L. Mutepfa, A.M. Khan, J.H. Els, S. Mbewana, A.A. van Dijk, E.P. Rybicki, I.I. Hitzeroth // *Viol J.* – 2015. – V. 12. – P. 205.

256. Perez, C.A. Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice / C.A. Perez, C. Eichwald, O. Burrone, D. Mendoza // *J Appl Microbiol.* – 2005. – V. 99, N 5. – P. 1158-1164.

257. Perez-Schael, I. Clinical Development, Registration and introduction of human rotavirus vaccines: the Latin American experience / I. Perez-Schael, M. M. O’Ryan, X. Saez-Lorens, A.C. Linhares, F.R. Velazquez, R.E. Colindres, T. Breuer, E. Ortega-Barria // *Trials in Vaccinol.* – 2012. – V. 1. – P. 10-20.

258. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, N 13, P. 1605–1612.
259. Phan, T.G. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan / T.G. Phan, P. Khamrin, T.D. Quang, S.K. Dey, S. Takanashi, S. Okitsu, N. Maneekarn, H. Ushijima // *J. Virol.* – 2007. – V. 81, N 9, –P. 4645-53.
260. Phan, T.G. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses / T.G. Phan, S. Okitsu, N. Maneekarn, H. Ushijima // *Infect. Genet. Evol.* – 2007. – V. 7, N 5. – P. 656-663.
261. Poelaert, D. A review of recommendations for rotavirus vaccination in Europe: Arguments for change / D. Poelaert, P. Pereira, R. Gardner, B. Standaert, B. Benninghoff // *Vaccine.* – 2018. – V. 36, N 17. – P. 2243-2253.
262. Potts, W.K. Pathogen-Based Models Favoring MHC Genetic Diversity / W.K. Potts, P.R. Slev // *Immunol. Rev.* – 1995. – V. 143. – P. 181-197.
263. Pradhan, G.N. Full genomic analysis of G1P[8] rotavirus strains recovered from rotavirus vaccinated and non-vaccinated children hospitalized for acute gastroenteritis in Pune, western India / G.N. Pradhan, S.D. Chitambar // *J Med Virol.* – 2018. – V. 90, N 4. – P. 772-778.
264. Pybus, O.G. The epidemic behavior of the hepatitis C virus / O.G. Pybus, M.A. Charleston, S. Gupta, A. Rambaut, E.C. Holmes, P.H. Harvey // *Science.* – 2001. – V. 292. – P. 2323–2325.
265. Pybus, O.G. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users / O.G. Pybus, A. Cochrane, E.C. Holmes, P. Simmonds // *Infect. Genet. Evol.* – 2005. – V. 5. – P. 131–139.
266. Pybus, O.G. Evolutionary epidemiology: preparing for an age of genomic plenty / O.G. Pybus, C. Fraser, A. Rambaut // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2013. – V. 368, N 1614. – P. 20120193.

267. Pyzik, M. FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin / M. Pyzik, T. Rath, W.I. Lencer, K. Baker, R.S. Blumberg // *J Immunol.* – 2015. – V. 194. – P. 4595–4603.

268. Quintero-Ochoa, G. Viral agents of gastroenteritis and their correlation with clinical symptoms in rotavirus-vaccinated children / G. Quintero-Ochoa, R. Romero-Argüelles, A. Aviles-Hernández, M. Cejudo-Flores, P. Calleja-García, M. Domínguez-Gámez, S. Cantú-Bernal, R. Icedo-García, J. Soñanez-Organis, J. Rosas-Rodríguez, C. Romo-Saenz, P. Tamez-Guerra, L. Flores-Mendoza, G. González-Ochoa // *Infect Genet Evol.* – 2019. – V. 73. – P. 190-196.

269. Rahman, M. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses / M. Rahman, J. Matthijssens, X. Yang, T. Delbeke, I. Arijs, K. Taniguchi, M. Iturriza-Gómara, N. Iftekharuddin, T. Azim, M. Van Ranst // *J. Virol.* – 2007. – V. 81, N 5. – P. 2382-2390.

270. Rainsford, E.W. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11 / E.W. Rainsford, M.A. McCrae // *Virus Res.* – 2007. V. 130, N 1-2. – P. 193-201.

271. Rambaut, A. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus / A. Rambaut, O.G. Pybus, M.I. Nelson, C. Viboud, J.K. Taubenberger, E.C. Holmes // *Nature.* – 2008. – V. 453. – P. 615–619

272. Rambaut, A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. / A. Rambaut, A.J. Drummond, D. Xie, G. Baele, M.A. Suchard // *Syst. Biol.* – 2018. – V. 67, N 5. – P. 901–904.

273. Ray, P.G. Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months / P.G. Ray, S.D. Kelkar, A.M. Walimbe, V. Biniwale, S. Mehendale // *J. Med. Virol.* – 2007. – V. 79. – P. 341–349.

274. Rennels, M.B. Influence of breast-feeding and oral poliovirus vaccine on the immunogenicity and efficacy of rotavirus vaccines / M.B. Rennels // *J. Infect. Dis.* – 1996. – V. 174 (Suppl 1). – P. 107–111.

275. Rennels, M.B. Safety and efficacy of high-dose rhesus human reassortant rotavirus vaccines: report of the National Multicenter Trial / M.B. Rennels, R.I. Glass, P.H. Dennehy, D.I. Bernstein, M.E. Pichichero, E.T. Zito, M.E. Mack, B.L. Davidson, A.Z. Kapikian // *Pediatrics*. – 1996. – V. 7. – P. 7–13.

276. Roczo-Farkas, S. Australian Rotavirus Surveillance Program: Annual Report, 2017 / S. Roczo-Farkas, D. Cowley, J.E. Bines; the Australian Rotavirus Surveillance Group // *Commun Dis Intell*. – 2018. – V. 16. – P. 43.

277. Rodriguez-Morales, A.J. History is repeating itself: Probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel Coronavirus Epidemic / A.J. Rodriguez-Morales, D.K. Bonilla-Aldana, G.J. Balbin-Ramon, A.A. Rabaan, R. Sah, A. Paniz-Mondolfi, P. Pagliano, S. Esposito // *Infez Med*. – 2020. – V. 28, N 1. – P. 3-5.

278. Rotavirus Classification Working Group
<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>

279. Ruiz, M.C. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections / M.C. Ruiz, J. Cohen, F. Michelangeli // *Cell Calcium*. – 2000. – V. 28, N 3. – P. 137-149.

280. Ruiz-Palacios, G.M. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis / G.M. Ruiz-Palacios, I. Pérez-Schael, F.R. Velázquez, H. Abate, T. Breuer, S.C. Clemens, B. Cheuvart, F. Espinoza, P. Gillard, B.L. Innis, Y. Cervantes, A.C. Linhares, P. López, M. Macías-Parra, E. Ortega-Barría, V. Richardson, D.M. Rivera-Medina, L. Rivera, B. Salinas, N. Pavía-Ruz, J. Salmerón, R. Rüttimann, J.C. Tinoco, P. Rubio, E. Nuñez, M.L. Guerrero, J.P. Yarzabal, S. Damaso, N. Tornieporth, X. Sáez-Llorens, R.F. Vergara, T. Vesikari, A. Bouckennooghe, R. Clemens, B. De Vos, M. O'Ryan; Human Rotavirus Vaccine Study Group. // *N. Engl. J. Med*. – 2006. – V. 354, N 1. – P. 11-22.

281. Santos, N. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine / N. Santos, Y. Hoshino // *Rev. Med. Virol*. – 2005. V. 15, N 1. – P. 29–56.

282. Sen, A. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3 / A. Sen, A.J. Pruijssers, T.S.

Dermody, A. García-Sastre, H.B. Greenberg // *J Virol.* – 2011. – V. 85. – P. 3717–3732.

283. Sharma, S. Detection of rotavirus- and norovirus-specific IgG memory B cells in tonsils / S. Sharma, M. Hagbom, J. Nordgren, J. Frodlund, J. Hinkula, T. Ledin, L. Svensson // *J Med Virol.* – 2019. – V. 91, N 2. – P. 326-329.

284. Sharp, P.M. Origins of human virus diversity / P.M. Sharp // *Cell.* – 2002. – V. 108. – P. 305–312.

285. Shuttleworth, G. Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice / G. Shuttleworth, D.C. Eckery, P. Awram // *Arch Virol.* – 2005. – V. 150, N 2. – P. 341-349.

286. Simon, A.K. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age / A.K. Simon, G.A. Hollander, A. McMichael // *Proc Biol Sci.* – 2015. – V. 282. – P. 20143085.

287. Simwaka, J.C. Diversity of rotavirus strains circulating in children under five years of age who presented with acute gastroenteritis before and after rotavirus vaccine introduction, University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia, 2008-2015 / J.C. Simwaka, E.M. Mpabalwani, M. Seheri, I. Peenze, M. Monze, B. Matapo, U.D. Parashar, J. Mufunda, J.M. Mphahlele, J.E. Tate, J.M. Mwenda // *Vaccine.* – 2018. – V. 36, N 47. – P. 7243-7247.

288. Soares-Weiser, K. Rotavirus vaccine for preventing diarrhoea / K. Soares-Weiser, E. Goldberg, G. Tamimi, O.C. Pitan, L. Leibovici // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2004. – V. 1. – P. CD002848.

289. Soares-Weiser, K. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use / K. Soares-Weiser, H. Bergman, N. Henschke, F. Pitan, N. Cunliffe // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2019. – V. 10. – P. CD008521.

290. Stack, J.C. Protocols for sampling viral sequences to study epidemic dynamics / J.C. Stack, J.D. Welch, M.J. Ferrari, B.U. Shapiro, B.T. Grenfell // *J. R. Soc. Interface.* – 2010. – V. 7. – P. 1119–1127.

291. Steele, A.D. Experiences with rotavirus vaccines: can we improve rotavirus vaccine impact in developing countries? / A.D. Steele, J.C. Victor, M.E. Carey, J.E. Tate, D.E. Atherly, C. Pecenka, Z. Diaz, U.D. Parashar, C.D. Kirkwood // *Hum Vaccin Immunother.* – 2019. – V. 15, N 6. – P. 1215-1227.
292. Suchard, M.A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 / M.A. Suchard, P. Lemey, G. Baele, D.L. Ayres, A.J. Drummond, A. Rambaut // *Virus Evolution.* – 2018. – V. 4, N 1. – P. vey016.
293. Suzuki, H. Rotavirus Replication: Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis / H. Suzuki // *Tohoku J Exp Med.* – 2019. V. 248, N4. – P. 285-296.
294. Svensson, L. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1) / L. Svensson, H. Sheshberadaran, T. Vesikari, E. Norrby, G. Wadell // *J Gen Virol.* – 1987. – V. 68. – P. 1993-1999.
295. Svensson, L. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections / L. Svensson, H. Sheshberadaran, S. Vene, E. Norrby, M. Grandien, G. Wadell // *J Gen Virol.* – 1987. – V. 68. – P. 643-651.
296. Tacharoenmuang, R. Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains / R. Tacharoenmuang, S. Komoto, R. Guntapong, T. Ide, P. Sinchai, S. Upachai, T. Yoshikawa, P. Tharmaphornpilas, S. Sangkitporn, K. Taniguchi // *PLoS One.* – 2016. – V. 11, N 11. – P. e0165826.
297. Tambo, E. Deciphering emerging Zika and dengue viral epidemics: Implications for global maternal-child health burden / E. Tambo, P.D. Chuisseu, J.Y. Ngogang, E.I. Khater // *J Infect Public Health.* – 2016. – V. 9, N 3. – P. 240-250.
298. Tan, M. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production / M. Tan, P. Huang, M. Xia, P.A. Fang, W. Zhong, M. McNeal, C. Wei, W. Jiang, X. Jiang // *J Virol.* – 2011. – V. 85. N 2. – P. 753-764.
299. Tang, B. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed

mutagenesis / B. Tang, J.M. Gilbert, S.M. Matsui, H.B. Greenberg // *Virology*. – 1997. – V. 237, N 1. – P. 89-96.

300. Tate, J.E. Uptake, impact, and effectiveness of rotavirus vaccination in the United States: review of the first 3 years of postlicensure data / J.E. Tate, M.M. Cortese, D.C. Payne, A.T. Curns, C. Yen, D.H. Esposito, J.E. Cortes, B.A. Lopman, M.M. Patel, J.R. Gentsch, U.D. Parashar // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – V. 30. – P. 56-60.

301. Tate, J.E. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis / J.E. Tate, A.H. Burton, C. Boschi-Pinto, A.D. Steele, J. Duque, U.D. Parashar; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network // *Lancet Infect. Dis.* – 2012. – V. 12. – P. 136–141.

302. Tatte, V.S. Full genome analysis of rotavirus G9P[8] strains identified in acute gastroenteritis cases reveals genetic diversity: Pune, western India / V.S. Tatte, D. Chaphekar, V. Gopalkrishna // *J Med Virol.* – 2017. – V. 89, N 8. – P. 1354-1363.

303. Tekewe, A. Integrated molecular and bioprocess engineering for bacterially produced immunogenic modular virus-like particle vaccine displaying 18 kDa rotavirus antigen / A. Tekewe, Y. Fan, E. Tan, A.P. Middelberg, L.H. Lua // *Biotechnol Bioeng.* – 2017. – V. 114, N 2. – P. 397-406.

304. Thanh, H.D. Emergence of Human G2P[4] Rotaviruses in the Post-vaccination Era in South Korea: Footprints of Multiple Interspecies Re-assortment Events / H.D. Thanh, V.T. Tran, I. Lim, W. Kim // *Sci Rep.* – 2018. – V. 16, N 8. – P. 6011.

305. Tihova, M. Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry / M. Tihova, K.A. Dryden, A.R. Bellamy, H.B. Greenberg, M. Yeager // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 314. – P. 985–992.

306. Tra My, P.V. The emergence of rotavirus G12 and the prevalence of enteric viruses in hospitalized pediatric diarrheal patients in southern Vietnam / P.V. Tra My, M.A. Rabaa, H. Vinh, E.C. Holmes, N.V. Hoang, N.T. Vinh, T. Phuong le,

N.T. Tham, P.V. Bay, J.I. Campbell, J. Farrar, S. Baker // *Am J Trop Med Hyg.* – 2011. – V. 85, N 4. – P. 768-775.

307. Tregnaghi, M.W. Human rotavirus vaccine is highly efficacious when co administered with routine expanded program of immunization vaccines including oral poliovirus vaccine in Latin America / M.W. Tregnaghi, H.J. Abate, A. Valencia, P. Lopez, T.R. Da Silveira, L. Rivera, D.M. Rivera Medina, X. Saez-Llorens, S.E. Gonzalez Ayala, T. De León, L.J. Van Doorn, M.D. Pilar Rubio, P.V. Suryakiran, J.M. Casellas, E. Ortega-Barria, I.V. Smolenov, H.H. Han; Rota-024 Study Group. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – V. 30, N 6. – P. 103-108.

308. Tsai, B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm / B. Tsai // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2007. – V. 23. – P. 23-43.

309. Tsai, M. K. Rotavirus gene structure and function / M.K. Tsai, J. Cohen // *Microbiol. Rev.* – 1989. – V. 53, N 4. – P. 410-449.

310. Uhlig, U. Impact of rotavirus vaccination in Germany: rotavirus surveillance, hospitalization, side effects and comparison of vaccines / U. Uhlig, K. Kostev, V. Schuster, S. Koletzko, H.H. Uhlig // *Pediatr Infect Dis J.* – 2014. – V. 33, N 11. – P. e299-304.

311. Velazquez, F.R. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections / F.R. Velázquez, D.O. Matson, J.J. Calva, L. Guerrero, A.L. Morrow, S. Carter-Campbell, R.I. Glass, M.K. Estes, L.K. Pickering, G.M. Ruiz-Palacios // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – V. 335, N 14. – P. 1022–1028.

312. Vesikari, T. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children / T. Vesikari, E. Isolauri, A. Delem, E. D'Hondt, F.E. André, G. Zissis // *Lancet.* – 1983. – V. 2. – P. 807-811.

313. Vesikari, T. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic / T. Vesikari, E. Isolauri, A. Delem, E. d'Hondt, F.E. André, G.M. Beards, T.H. Flewett // *J. Pediatr.* – 1985. V. 107, N 2. – P. 189-194.

314. Vesikari, T. Safety and immunogenicity of RIX 4414 live attenuated human rotavirus vaccine / T. Vesikari, A. Karvonen, T. Korhonen, M. Espo, E.

Lebacqz, J. Forster, F. Zepp, A. Delem, B. De Vos // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – P. 2836–2842.

315. Vizzi, E. Human rotavirus strains circulating in Venezuela after vaccine introduction: Predominance of G2P[4] and reemergence of G1P[8] / E. Vizzi, O.A. Piñeros, M.D. Oropeza, L. Naranjo, J.A. Suárez, R. Fernández, J.L. Zambrano, A. Celis, F. Liprandi // *Virol J*. – 2017. – V. 14, N 1. – P. 58.

316. Volz, E.M. Phylodynamics of infectious disease epidemics / E.M. Volz, S.L. Kosakovsky Pond, M.J. Ward, A.J. Leigh Brown, S.D. Frost // *Genetics*. – 2009. – Vol. 183. – P. 1421–1430.

317. Volz, E.M. Complex population dynamics and the coalescent under neutrality / E.M. Volz // *Genetics*. – 2012. – V. 190. – P. 187–201.

318. Volz, E.M. Viral phylodynamics / E.M. Volz, K. Koelle, T. Bedford // *PLoS Comput Biol*. – 2013. – V. 9, N 3. – P. e1002947.

319. Wang, Y.H. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013 / Y.H. Wang, B.B Pang, S. Ghosh, Z. Zhou, T. Shintani, N. Urushibara, Y.W. Song, M.Y. He, M.Q. Liu, W.F. Tang, J.S. Peng, Q. Hu, D.J. Zhou, N. Kobayashi // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N 3. – P. e88850.

320. Wang, Y. Clinical and molecular epidemiologic trends reveal the important role of rotavirus in adult infectious gastroenteritis, in Shanghai, China / Y. Wang, J. Zhang, P. Liu // *Infect Genet Evol*. – 2017. – V. 47. – P. 143-154.

321. Ward, R.L. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups / R.L. Ward, O. Nakagomi, D.R. Knowlton, M.M. McNeal, T. Nakagomi, J.D. Clemens, D.A. Sack, G.M. Schiff // *J Virol*. – 1990. – V. 64, N 7. – P. 3219-3225.

322. Ward, R.L. Rotavirus vaccines: how they work or don't work / R.L. Ward // *Expert. Rev. Mol. Med*. – 2008. – V. 10. – P. 1-14.

323. Ward, R.L. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease / R.L. Ward // *Pediatr. Infect. Dis. J*. – 2009. – V. 28. – P. 57–59.

324. Ward, R.L. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world / R.L. Ward, D.I. Bernstein // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – V. 48, N 2. – P. 222–228.
325. Wei, J. Identification of an HLA-A*0201-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in rotavirus VP6 protein / J. Wei, J.T. Li, X.P. Zhang, Y. Tang, J.X. Wang, B. Zhang, Y.Z. Wu // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V. 87. – P. 3393–3396.
326. Wei, J. A naturally processed epitope on rotavirus VP7 glycoprotein recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic CD8⁺ T cells / J. Wei, J. Li, X. Zhang, Y. Tang, J. Wang, Y. Wu // *Viral Immunol.* – 2009. – V. 22, N 3. – P. 189-194.
327. World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11-12 June 2014 / WHO // *Weekly Epidemiological Record.* – 2014. – V. 29, N 89. – P. 321–336.
328. Wu, F.T. Molecular epidemiology of human G2P[4] rotaviruses in Taiwan, 2004-2011 / F.T. Wu, K. Bányai, B. Jiang, C.Y. Wu, H.C. Chen, E. Fehér, Y.C. Huang, J.S. Lin, F.C. Huang, C.A. Hsiung, J.C. Huang, H.S. Wu // *Infect Genet Evol.* – 2014. – V. 28. – P. 530-536.
329. Xie, L. Immunogenicity and efficacy in mice of an adenovirus-based bicistronic rotavirus vaccine expressing NSP4 and VP7 / L. Xie, M. Yan, X. Wang, J. Ye, K. Mi, S. Yan, X. Niu, H. Li, M. Sun // *Virus Res.* – 2015. – V. 210. – P. 298-307.
330. Yamamoto, S.P. Gastroenteritis Outbreaks Caused by a DS-1–like G1P[8] Rotavirus Strain, Japan, 2012–2013 / S.P. Yamamoto, A. Kaida, H. Kubo, N. Iritani // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – V. 20, N 6. – P. 1030-1033.
331. Yang, K. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection / K. Yang, S. Wang, K.O. Chang, S. Lu, L.J. Saif, H.B. Greenberg, J.P. Brinker, J.E. Herrmann // *Vaccine.* – 2001. – V. 19, N 23-24. – P. 3285-3291.
332. Yodmeeklin, A. Increasing predominance of G8P[8] species A rotaviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Thailand, 2010-2013 / A. Yodmeeklin, P. Khamrin, K. Kumthip, R. Malasao, N. Ukarapol, H. Ushijima, N. Maneekarn // *Arch Virol.* – 2018. – V. 163, N 8. – P. 2165-2178.

333. Yuan, L. Mucosal and systemic antibody responses and protection induced by a prime/boost rotavirus-DNA vaccine in a gnotobiotic pig model / L. Yuan, M.S. Azevedo, A.M. Gonzalez, K.I. Jeong, T. Van Nguyen, P. Lewis, C. Iosef, J.E. Herrmann, L.J. Saif // *Vaccine*. – 2005. – V. 23, N 30. – P. 3925-3936.

334. Zaki, A. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Saudi Arabia: A single hospital-based study / A. Zaki, M. Abousekkien, U.M. Alkholy, A. Eid // *Arab J Gastroenterol*. – 2017. – V. 18, N 3. – P. 140-143.

335. Zeller, M. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq / M. Zeller, J.T. Patton, E. Heylen, S. De Coster, M. Ciarlet, M. Van Ranst, J. Matthijnssens // *J. Clin. Microbiol*. – 2012. – V. 50, N 3. – P. 966-976.

336. Zeller, M. Emerging OP354-Like P[8] Rotaviruses Have Rapidly Dispersed from Asia to Other Continents / M. Zeller, E. Heylen, S. Damanka, C. Pietsch, C. Donato, T. Tamura, R. Kulkarni, R. Arora, N. Cunliffe, L. Maunula, C. Potgieter, S. Tamim, S.D. Coster, E. Zhirakovskaya, S. Bdour, H. O'Shea, C.D. Kirkwood, M. Seheri, M.M. Nyaga, J. Mphahlele, S.D. Chitambar, R. Dagan, G. Armah, N. Tikunova, M. Van Ranst, J. Matthijnssens // *Mol Biol Evol*. – 2015. – V. 32, N 8. – P. 2060-2071

337. Zeller, M. Genome-Wide Evolutionary Analyses of G1P[8] Strains Isolated Before and After Rotavirus Vaccine Introduction / M. Zeller, C. Donato, N.S. Trovão, D. Cowley, E. Heylen, N.C. Donker, J.K. McAllen, A. Akopov, E.F. Kirkness, P. Lemey, M. Van Ranst, J. Matthijnssens, C.D. Kirkwood // *Genome. Biol. Evol*. – 2015. - V. 7, N 9. - P. 2473-2483.

338. Zeng, Y. Molecular characterization of an uncommon multigene Reassortant G1P[4] rotavirus identified in China / Y. Zeng, B. Zhao, T. Li, S. Zhang, Y. Wang, H. Xu, S. Ge, N. Xia // *Infect Genet Evol*. – 2020. – V. 85. – P. 104413.

339. Zhao, W. Identification of rotavirus VP6-specific CD4+ Tcell epitopes in a G1P[8] human rotavirus-infected rhesus Macaque / W. Zhao, B. Pahar, K. Sestak // *Virology(Auckl)*. – 2008. - V. 1. – P. 9–15.

340. Zhirakovskaia, E. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009-2012 / E. Zhirakovskaia, A. Tikunov, A. Tymentsev, S. Sokolov, D. Sedelnikova, N. Tikunova // *Infect Genet Evol.* – 2019. – V. 67. – P. 167-182.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1А. Перечень нуклеотидных последовательностей гена VP7 нижегородских РВА, использованных в сравнительном анализе с вакцинными штаммами

№.№ пп	Номер изолята	Год изоляции	G[P]-тип	Аллель	Номер GenBank
1.	1137	2011	G1P[8]	G1-1	KM288558
2.	1146	2011	G1P[8]		KM288561
3.	163	2013	G1P[8]		KM288565
4.	542	2013	G1P[8]		KM288566
5.	593	2013	G1P[8]		KM288567
6.	162	2016	G1P[8]		KX545326
7.	1358	2016	G1P[8]		MN337576
8.	2422	2017	G1P[8]		MN337576
9.	746	2009	G1P[8]	G1-2c	KM288556
10.	764	2009	G1P[8]		KM288557
11.	1143	2011	G1P[8]		KM288559
12.	1144	2011	G1P[8]		KM288560
13.	321	2012	G1P[8]		KM288562
14.	939	2012	G1P[8]		KM288563
15.	2212	2012	G1P[8]		KM288564
16.	1020	2015	G1P[8]		KX545313
17.	1102	2015	G1P[8]		KX545312
18.	79	2016	G1P[8]		KX545324
19.	1918	2016	G1P[8]		MN337577
20.	2149	2016	G1P[8]		MN337578
21.	271	2017	G1P[8]		MN337580
22.	347	2017	G1P[8]		MN337581
23.	381	2017	G1P[8]		MN337582
24.	2928	2017	G1P[8]		MN337584
25.	2982	2017	G1P[8]		MN337585
26.	271	2017	G1P[8]		MW132494
27.	347	2017	G1P[8]		MW132495
28.	381	2017	G1P[8]		MW132496
29.	2422	2017	G1P[8]		MW132497
30.	2928	2017	G1P[8]		MW132498
31.	2982	2017	G1P[8]		MW132499
32.	1736	2019	G1P[8]		MW132500

33.	980	2020	G1P[8]		MW132501	
34.	1150	2020	G1P[8]		MW132502	
35.	2406	2011	G2P[4]	G2- IVa-1	KM288568	
36.	2578	2011	G2P[4]		KM288569	
37.	159	2016	G2P[4]		MF581802	
38.	262	2016	G2P[4]		MF581803	
39.	2639	2017	G2P[4]		MT149295	
40.	274	2018	G2P[4]		MT149297	
41.	287	2018	G2P[4]		MT149298	
42.	167	2019	G2P[4]		MT149289	
43.	464	2016	G2P[4]		G2- IVa-3	MF581804
44.	611	2016	G2P[4]			MF581806
45.	272	2017	G2P[4]	MT149296		
46.	557	2017	G2P[4]	MN206133		
47.	356	2017	G2P[4]	MW132504		
48.	475	2017	G2P[4]	MW132505		
49.	122	2018	G2P[4]	MT149287		
50.	134	2018	G2P[4]	MT149288		
51.	184	2018	G2P[4]	MT149290		
52.	2131	2018	G2P[4]	MT149292		
53.	2134	2018	G2P[4]	MT149293		
54.	2170	2018	G2P[4]	MT149294		
55.	3047	2018	G2P[4]	MT149299		
56.	3051	2018	G2P[4]	MT149300		
57.	53	2019	G2P[4]	MT149301		
58.	73	2019	G2P[4]	MT149302		
59.	75	2019	G2P[4]	MT149303		
60.	208	2019	G2P[4]	MT149291		
61.	110	2020	G2P[4]	MW132506		
62.	174	2020	G2P[4]	MW132507		
63.	2578	2017	G3P[8]	G3-1	--	
64.	1376	2019	G3P[8]		MW132509	
65.	1589	2019	G3P[8]		MW132510	
66.	1376	2019	G3P[8]		MW132511	
67.	25	2020	G3P[4]		MW132512	
68.	102	2020	G3P[8]		MW132513	
69.	104	2020	G3P[8]		MW132514	
70.	140	2020	G3P[8]		MW132515	
71.	780	2020	G3P[8]		MW132516	
72.	1057	2020	G3P[8]		MW132517	
73.	1166	2020	G3P[8]		MW132518	
74.	1289	2020	G3P[8]		MW132519	

75.	1306	2020	G3P[8]		MW132520
76.	1587	2020	G3P[8]		MW132521
77.	1708	2020	G3P[8]		MW132522
78.	1975	2020	G3P[8]		MW132523
79.	1976	2020	G3P[8]		MW132524
80.	880	2013	G3P[8]	G3-3a	KM288570
81.	471	2016	G3P[9]		MW132508
82.	2866	2017	G3P[8]		--
83.	1105	2020	G3P[9]		MW132525
84.	1241	2020	G3P[9]		MW132526
85.	1252	2020	G3P[9]		MW132527
86.	2447	2012	G3P[9]	G3-3e	KM288571
87.	2457	2012	G3P[9]		KM288572
88.	2461	2012	G3P[9]		KM288573
89.	2711	2012	G3P[9]		KM288574
90.	496	2016	G3P[9]		MF581805
91.	148	2017	G3P[9]		--
92.	486	2008	G4P[8]	G4-1c	KM288578
93.	552	2008	G4P[8]		KM288579
94.	544	2009	G4P[8]		KM288575
95.	934	2012	G4P[8]		KJ162419
96.	1354	2012	G4P[8]		KJ162420
97.	110	2013	G4P[8]		KM288576
98.	118	2013	G4P[8]		KM288577
99.	3846	2013	G4P[8]		KM288580
100.	395	2015	G4P[8]		KX545315
101.	1032	2015	G4P[8]		KX545314
102.	88	2016	G4P[8]		KX545323
103.	390	2016	G4P[8]		MW132528
104.	3025	2016	G4P[8]		MW132529
105.	1356	2017	G4P[8]		MW132530
106.	2192	2018	G4P[8]		MW132531
107.	69	2019	G4P[8]	MW132532	
108.	2505	2015	G6P[9]	G6-I	MF590372
109.	1061	2016	G6P[9]		--
110.	414	2015	G9P[8]	G9-III	KX545308
111.	441	2015	G9P[8]		KX545309
112.	100	2016	G9P[8]		KX545325
113.	176	2016	G9P[8]		KX545327
114.	701	2016	G9P[8]		MW132536
115.	2155	2016	G9P[8]		MW132537
116.	2548	2016	G9P[8]		MW132538
117.	2885	2016	G9P[8]		MW132539

118.	714	2019	G9P[8]		MW132540
119.	862	2019	G9P[8]		MW132542
120.	871	2019	G9P[8]		MW132543
121.	839	2020	G9P[8]		MW132545
122.	877	2020	G9P[8]		MW132546
123.	856	2019	G9P[8]		G9-IVe
124.	830	2020	G9P[4]	MW132544	

Таблица 2А. Перечень нуклеотидных последовательностей гена VP4 нижегородских РВА, использованных в сравнительном анализе с вакцинными штаммами

№№ пп	Номер изолята	Год изоляции	G[P]-тип	Аллель	Номер GenBank
1.	1083	2008	G4P[8]	P[8]-3	GU226782
2.	520	2009	G4P[8]		GU226775
3.	544	2009	G4P[8]		GU226776
4.	746	2009	G1P[8]		GU226777
5.	750	2009	G1P[8]		GU226778
6.	763	2009	G1P[8]		GU226779
7.	764	2009	G1P[8]		GU226780
8.	786	2009	G1P[8]		GU226781
9.	830	2011	G4P[8]		KM288553
10.	1144	2011	G1P[8]		KM288554
11.	2626	2011	G9P[8]		KC677702
12.	445	2012	G9P[8]		KC677703
13.	459	2012	G9P[8]		KC677704
14.	542	2013	G1P[8]		KM288555
15.	561	2013	G9P[8]		KC677705
16.	395	2015	G4P[8]		KX545299
17.	1020	2015	G1P[8]		KX545305
18.	1032	2015	G4P[8]		KX545301
19.	1102	2016	G1P[8]		KX545304
20.	79	2016	G1P[8]		KX545318
21.	176	2016	G9P[8]		KX545320
22.	714	2019	G9P[8]		MW132471
23.	856	2019	G9P[8]		MW132472
24.	862	2019	G9P[8]		MW132473
25.	871	2019	G9P[8]		MW132474
26.	2292	2019	G9P[8]		MW132475
27.	839	2020	G9P[8]		MW132477

28.	877	2020	G9P[8]	P[4]-4a	MW132478
29.	1150	2020	G1P[8]		MW132480
30.	159	2016	G2P[4]		MF581807
31.	287	2018	G2P[4]		MT149309
32.	3047	2018	G2P[4]		MT149310
33.	134	2018	G2P[4]		MW132460
34.	274	2018	G2P[4]		MW132461
35.	167	2019	G2P[4]		MT149304
36.	208	2019	G2P[4]		MT149305
37.	464	2016	G2P[4]		P[4]-4b
38.	611	2016	G2P[4]	KX545322	
39.	557	2017	G2P[4]	MN206131	
40.	2131	2018	G2P[4]	MT149306	
41.	2134	2018	G2P[4]	MT149307	
42.	2170	2018	G2P[4]	MT149308	
43.	3051	2018	G2P[4]	MT149311	
44.	53	2019	G2P[4]	MT149312	
45.	73	2019	G2P[4]	MT149314	
46.	75	2019	G2P[4]	MT149313	
47.	110	2020	G2P[4]	MW132465	
48.	174	2020	G2P[4]	MW132466	

Таблица 3А. Перечень нуклеотидных последовательностей гена VP6 нижегородских РВА, использованных в сравнительном анализе с вакцинными штаммами

№№ пп	Номер изолята	Год изоляции	G[P]-тип	Генотип	Номер GenBank
1.	2715	2011	G4P[8]	I1	KJ162412
2.	2626	2011	G9P[8]		KC689354
3.	445	2012	G9P[8]		KC689355
4.	459	2012	G9P[8]		KC689356
5.	561	2012	G9P[8]		KC689357
6.	934	2012	G4P[8]		KJ162413
7.	1354	2012	G4P[8]		KJ162414
8.	435	2014	G1P[8]		KX758599
9.	439	2014	G1P[8]		KX758600
10.	1034	2014	G1P[8]		KX758601
11.	2721	2014	G9P[8]		KY807544
12.	3117	2014	G9P[8]		KY807547
13.	441	2015	G9P[8]		KY807545

14.	414	2015	G9P[8]	I2	KY807546
15.	79	2016	G1P[8]		KY271802
16.	88	2016	G4P[8]		KY271803
17.	100	2016	G9P[8]		KY271804
18.	176	2016	G9P[8]		KY271805
19.	266	2016	G4P[8]		MF581797
20.	268	2016	G4P[8]		MF581798
21.	291	2016	G9P[8]		KY807548
22.	299	2016	G9P[8]		KY271806
23.	304	2016	G1P[8]		MF581799
24.	159	2015	G2P[4]		KY271807
25.	2505	2015	G6P[9]		KY271811
26.	262	2016	G2P[4]		KY271808
27.	464	2016	G2P[4]		KY271809
28.	611	2016	G2P[4]		KY271810
29.	496	2016	G3P[9]		KY271812
30.	705	2016	G3P[9]		MF581800

Таблица 4А. Перечень нуклеотидных последовательностей гена NSP4 нижегородских РВА, использованных в сравнительном анализе с вакцинными штаммами

№№ пп	Номер изолята	Год изоляции	G[P]-тип	Генотип	Номер GenBank
1.	79	2016	G1P[8]	E1	KY271792
2.	88	2016	G4P[8]		KY271793
3.	100	2016	G9P[8]		KY271794
4.	176	2016	G9P[8]		KY271795
5.	268	2016	G4P[8]		MF581794
6.	291	2016	G9P[8]		MF581795
7.	304	2016	G1P[8]		MF581796
8.	268	2016	G4P[8]		MF581794
9.	291	2016	G9P[8]		MF581795
10.	159	2016	G2P[4]	E2	KY271796
11.	262	2016	G2P[4]		KY271797
12.	464	2016	G2P[4]		KY271798
13.	611	2016	G2P[4]		KY271799
14.	2505	2015	G3P[9]	E3	KY271800
15.	496	2016	G6P[9]		KY271801