



Филодинамическая характеристика российской популяции ротавируса A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus*) на основе гена VP6

Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия

Введение. Ротавирусы вида А являются одной из лидирующих причин острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни. В настоящее время ротавирусная инфекция относится к управляемым инфекционным процессам. Наиболее представленным протеином ротавириона является белок VP6.

Материал и методы. В качестве материала для исследования были использованы 262 нуклеотидные последовательности гена VP6 ротавируса вида А, изолированного на территории России. Филогенетический анализ и расчет филодинамических характеристик были осуществлены с использованием пакета программ BEAST v.1.10.4. Выведение и анализ аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGAX.

Результаты. На территории Российской Федерации показана циркуляция ротавирусов 3 сублиний генотипа I1 и 3 – генотипа I2. Установлен уровень накопления мутаций, который оказался схожим для генотипов I1 и I2 и составил $7,732E-4$ и $1,008E-3$ нуклеотидов/сайт/год соответственно. Показано, что эффективные размеры ротавирусной популяции гена VP6 I1 и I2 генотипов стабильны и с начала 2000-х гг. имеют тенденцию к снижению. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности в области сайтов внутриклеточной нейтрализации А (231–260 а.о.) и В (265–292 а.о.) позволил выявить у ряда российских штаммов генотипа I1 мутацию в позиции V252I, а у части из них (I1 и I2 генотипов) – мутацию I281V, не связанные с принадлежностью штаммов к внутритиповым сублиниям. Анализ 3 Т-клеточных эпитопов выявил 4 ассоциированных с принадлежностью к одной из геногрупп аминокислотных различия (в позициях 305, 315, 342 и 348 а.о.).

Заключение. На основе филодинамических характеристик и аминокислотного состава антигенных детерминант сделан вывод о высокой консервативности протеина VP6.

Ключевые слова: ротавирус; вакцинация; филодинамический анализ

Для цитирования: Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Филогенетическая характеристика российской популяции ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus*) на основе гена VP6. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(6): 364-372. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-7>

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Участие авторов: все авторы внесли равный вклад в подготовку публикации.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.10.2020

Принята в печать 12.11.2020

Phyldynamic characteristics of the Russian population of rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus*) based on the VP6 gene

Ol'ga V. Morozova, Tatiana F. Sashina, Nadezhda A. Novikova

FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

Introduction. Rotavirus A is one of the leading causes of acute gastroenteritis in children in the first years of life. Rotavirus infection is currently classified as a preventable infection. The most abundant rotavirion protein is VP6.

Material and methods. Phylogenetic analysis and calculation of phyldynamic characteristics were carried out for 262 nucleotide sequences of the VP6 gene of rotavirus species A, isolated in Russia, using the BEAST v.1.10.4 software package. The derivation and analysis of amino acid sequences was performed using the MEGAX program.

Results. This study provides phyldynamic characteristics of the rotaviruses in Russia based on the sequences coding VP6 protein. Bayesian analysis showed the circulation of rotaviruses of three sublineages of genotype I1 and three sublineages of genotype I2 in Russia. The level of accumulation of mutations was established, which turned out to be similar for genotypes I1 and I2 and amounted to $7.732E-4$ and $1.008E-3$ nucleotides/site/year, respectively. The effective population sizes based on nucleotide sequences of the VP6 I1 and I2 genotypes are

relatively stable while after the 2000s there is a tendency of its decreasing. Comparative analysis of the amino acid sequences in the region of the intracellular neutralization sites A (231–260 aa) and B (265–292 aa) made it possible to reveal a mutation in position V252I in a proportion of Russian strains of genotype I1 some strains of genotypes I1 and I2 had mutation I281V. These substitutions were not associated with any sublineages to which the strains belong. The analysis of three T-cell epitopes revealed four amino acid differences (in aa positions 305, 315, 342, 348) that were associated with the first or second genogroup.

Conclusion. Based on the phylodynamic characteristics and amino acid composition of antigenic determinants, it was concluded that the VP6 protein is highly stable and could potentially be a good model for development of a rotavirus vaccine.

Key words: *Rotavirus; vaccines; phylodynamic analysis.*

For citation: Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Phylodynamic characteristics of the Russian population of rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus*) based on the VP6 gene. *Problems of Virology. (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(6): 364-372. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-7>

For correspondence: Ol'ga V. Morozova, Researcher of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, FBSI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, 603950, Russia. E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Information about authors:

Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Contribution: all the authors have equally contributed to the development of the article.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 2 October 2020
Accepted 11 November 2020

Введение

Ротавирусы вида А (семейство *Reoviridae*, подсемейство *Sedoreovirinae*, род *Rotavirus*) являются одной из основных причин острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни [1]. Ротавирус А (РВА) выступает этиологическим фактором гастроэнтеритов в 43% случаев у детей до 5 лет, находящихся на стационарном лечении в России. В структуре амбулаторных обращений ротавирусный гастроэнтерит составляет 31%, достигая в некоторых регионах нашей страны 75% [2]. В Российской Федерации сезонность ротавирусной инфекции (РВИ) описывается как зимне-весенняя [3].

В настоящее время в мире широко применяются 2 ротавирусные вакцины: моновалентная человеческая живая аттенуированная вакцина жидкая для профилактики ротавирусной инфекции (РВИ), основанная на штамме ротавируса человека с генотипом G1P[8], и вакцина для профилактики ротавирусной инфекции пентавалентная живая (RV5), несущая в своём составе реассортантные штаммы ротавируса быка и ротавирусов человека с генотипами G1, G2, G3, G4 и P[8] [4, 5]. Преквалификацию ВОЗ прошли вакцинные препараты Rotavac® (G9P[11]) и Rotasil® (G1, G2, G3, G4, G9), которые скоро будут доступны на мировом рынке [6, 7]. На территории РФ зарегистрирована только RV5, рекомендованная к применению в соответствии с эпидемическими показаниями¹.

Ген VP6 имеет размер 1,6 т.п.н., кодирует групповой и субгрупповой антигены. VP6 был первым

белком, использованным для классификации ротавирусов на основе его серологической перекрёстной реактивности и генетической изменчивости. Внутри ротавирусов вида А с помощью моноклональных антител выделяют 4 субгруппы (SGI, SGII, SG I + II и SG не-I, не-II) [8, 9]. В настоящее время на основе генетического разнообразия VP6 различают 9 групп А-I ротавируса, которые в последнее время приобрели статус видов. От людей изолированы виды А, В, С и Н, хотя, безусловно, первый из них является наиболее важным в мире с эпидемической точки зрения [10, 11]. Выявленные на основе анализа нуклеотидной последовательности различия, превышающие 19%, позволяют говорить о разных генотипах VP6 ротавируса вида А. На сегодняшний день известно 26 генотипов VP6 РВА (I1–I26), изолированных от человека и животных. Несмотря на генотиповое многообразие ротавирусов, эпидемически значимые варианты относятся к 2 геногруппам: 1-я – это Wa-подобные ротавирусы, 2-я – DS-1-подобные. В составе вакцины RV1, содержащей Wa-подобный штамм 89-12 ротавируса человека, белок VP6 относится к 1-й геногруппе (генотип I1). Вакцинный препарат RV5 (основан на DS-1-подобном штамме WC3 бычьего ротавируса) содержит VP6 2-й геногруппы (генотип I2).

После перенесённой РВИ обнаруживают высокие титры антител против протеина VP6. В его структуре выявлено несколько В- и Т-клеточных антигенных

¹Приказ Минздрава России от 21.03.2014 N 125н. <https://www.rosпотребнадзор.ru/bitrix/redirect.php?event1=file&event2=download&event3=natskalendar-porfprivivok-2014.doc&goto=/upload/iblock/d12/natskalendar-porfprivivok-2014.doc> (дата доступа 22.11.2020 г.)

эпитопов. Исследования антигенных свойств этого белка показали, что субгрупповые эпитопы являются конформационными и доступны лишь на поверхности тримера, но не на мономерной единице белковой молекулы. Установлено, что одиночная мутация в положениях 172 или 305 и 296–299 влияет на связывание антител субгруппы I (SGI) [12]. Двойная аминокислотная замена в положениях 305–306 и одиночная аминокислотная мутация в положении 315 влияют на процесс связывания антител, распознающих эпитоп субгруппы II (SGII) [12, 13]. В работе Aiyegbo M.S. с соавт. были предложены 2 предполагаемых антигенных эпитопа для внутриклеточных антител, расположенных на VP6: A (231–260 а.о.) и B (265–292 а.о.). Этой группой исследователей показано, что иммуноглобулины класса IgA человека, связываясь внутри клетки с субвирусной двухслойной частицей, блокируют транскрипцию ротавируса [14].

Программное обеспечение BEAST, разработанное на основе байесовского эволюционного анализа с интеграцией цепи Маркова (Markov chain Monte Carlo, MCMC), позволяет оценивать филогенетические деревья, построенные на основе генетических данных с метками времени [15]. Такой подход помогает оценить эволюционные процессы в популяции, если в ней произошли доступные для измерений изменения между отборами проб. Эффективный размер популяции (N_e) – один из важнейших параметров популяционной генетики, который переводит размер реальной популяции в размер идеализированной, демонстрирующей ту же скорость изменения генетического разнообразия, что и реальная [16]. В нашей работе на основе гена VP6 ротавирусов, изолированных на территории России, проведена оценка филогенетических параметров, таких как скорость накопления мутаций, время циркуляции ближайшего общего предка, скорость изменений эффективного размера популяции с течением времени. Кроме этого, на исследованной выборке выполнен сравнительный анализ аминокислотного состава в области В- и Т-клеточных эпитопов вакцинных штаммов в составе RV1 и RV5, а также штаммов дикого типа, изолированных на территории России.

Материал и методы

Формирование выборки. Для изучения разнообразия аллелей гена VP6 исследуемых ротавирусов были проанализированы доступные в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности размером, покрывающим более 80% открытой рамки считывания. В выборку вошли нуклеотидные последовательности гена VP6 вакцинных штаммов (RV1 и RV5), а также 262 последовательности VP6 ротавирусов, доступных в базе GenBank и изолированных после 2010 г. на территории России в Нижнем Новгороде (23), Новосибирске (203), Омске (29), Смоленске (4), Ханты-Мансийске (3). В исследуемой выборке 206 последовательностей гена VP6 принадлежали генотипу I1 и 56 – генотипу I2. Последовательности гена других генотипов РВА, изолированных на территории РФ, не были представлены в указанной базе данных.

Филодинамический анализ. Обработку и выравнивание последовательностей нуклеотидов и выведение аминокислотных последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения MEGAX [17]. В связи с тем что различные генотипы могут обладать разными филогенетическими характеристиками, анализ временного сигнала, оценка скорости накопления мутаций и особенности популяционной динамики оценивались отдельно для последовательностей генотипов I1 и I2. С целью построения филогенетических деревьев ML (Maximum Likelihood, максимального правдоподобия) была подобрана оптимальная модель для исследуемых выборок – T92+G+I. При первичной оценке временного сигнала на основе филогенетического дерева ML использовали программу TempEst v1.5.3 [18]. Оба набора данных показали положительную корреляцию между генетической дистанцией и датой отбора, что делает их подходящими для дальнейшего байесовского филогенетического анализа. Кроме этого, анализ показал необходимость применения «расслабленных» молекулярных часов для исследуемых выборок. Филогенетический анализ проведен с помощью пакета программ BEAST v.1.10.4 и библиотеки BEAGLE v3.1.0 [15, 19]. Процесс замещения нуклеотидов оценивали с помощью модели Хасегава–Кишино–Яно (Hasegawa–Kishino–Yano, HKY). Расчёт динамики демографических показателей выполнен на основе модели SkyGrid [20]. Скорость эволюции измеряли на базе нестрогих (свободных) логнормальных часов. Для достижения значений эффективного размера выборки (ESS) >> 200 длина MCMC составила 80 млн шагов. Визуализация и обработка филогенетических деревьев осуществлена в программе FigTree v.1.4.3. Визуализацию популяционной динамики и анализа выходных MCMC-файлов оценивали при помощи программы Tracer v1.7.1 [21].

Анализ антигенных эпитопов. Поиск В- и Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием базы данных IEDB (international epitope database; https://www.iedb.org/home_v3.php). В исследование входили эпитопы, установленные на изолированных от человека ротавирусах вида А.

Результаты

Филогенетический анализ. Для оценки кластеризации российских штаммов и их взаимоотношений со штаммами в составе вакцин RV5 и RV1 на основе общей выборки, включавшей генотипы I1 и I2, было сконструировано филогенетическое дерево, представленное на **рис. 1**. Вакцинный штамм RV1 кластеризуется отдельно от ротавирусов дикого типа российского происхождения. 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 штаммов, изолированных в разных регионах РФ на протяжении 2010–2018 гг. К линии I1-2 принадлежат

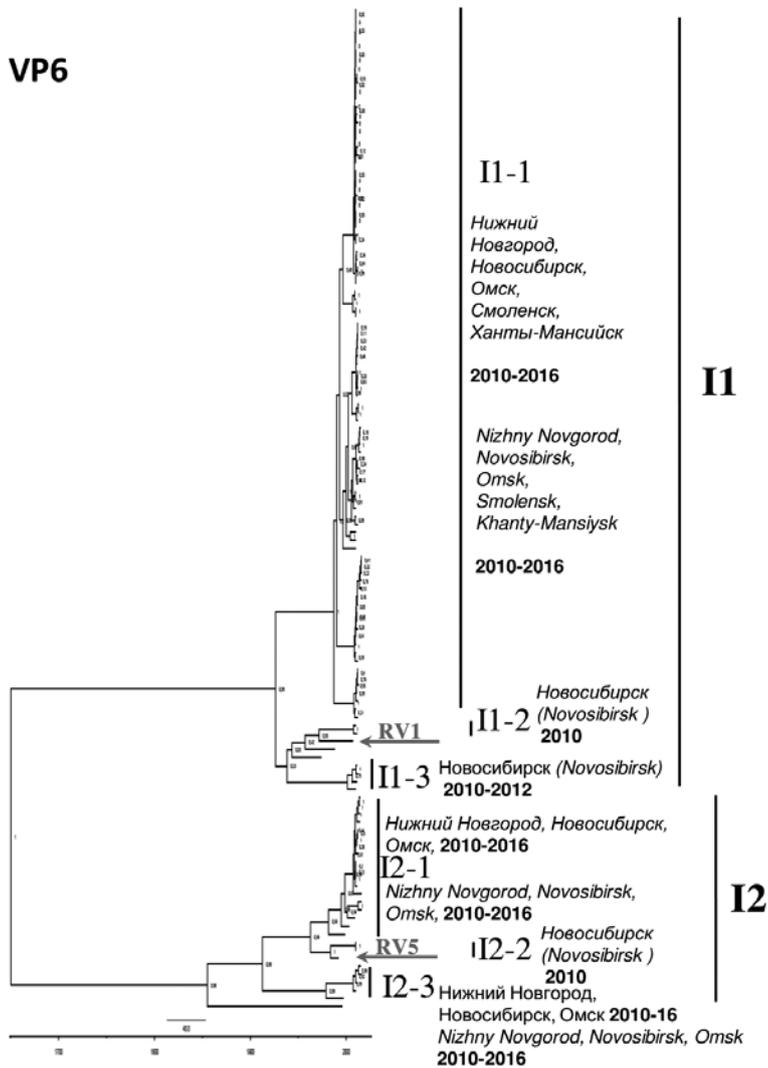


Рис. 1. Байесово филогенетическое дерево MCC, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена *VP6* российских образцов ротавирусов дикого типа и вакцинных штаммов *RV5* и *RV1*.

Примечание. MCC – филогенетическое дерево с максимальной надёжностью клайдов.

Fig. 1. Bayesian MCC phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the *VP6* gene of Russian wild-type rotavirus samples' strains and vaccine strains *RV5* and *RV1*.

Note. MCC – maximum clade credibility phylogenetic tree.

штаммы с генотипами G4P[8] и G1P[8], изолированные в Новосибирске в 2010 г. В группу I1-3 вошли ротавирусы с генотипом G4P[6], также выделенные в Новосибирске (2010–2016 гг.).

Ротавирусы 2-й геногруппы представлены на филогенетическом дереве 3 кластерами (с апостериорной вероятностью 0,99) I2-1–I2-3. Вакцинные штаммы *RV5* относятся к сублинии I2-2, также как и 2 выделенные в 2010 г. новосибирских изолята. Большинство «российских» PBA 2-й 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.

Уровень мутаций и tMRCA. Уровень накопления мутаций у «российских» штаммов с генотипом I1 был несколько ниже, чем у I2 – 7,732E-4 и 1,008E-3 соответственно (табл. 1). Для каждой линии внутри генотипа уровень мутаций варьировал незначительно.

Время циркуляции ближайшего общего предка (time to the most recent common ancestor, tMRCA) датируется 1983 г. для кластера I1-1, включающего большинство PBA российского происхождения группы I1, 1973 г. для I1-2 (куда входил штамм в составе вакцины *RV1*) и 1951 г. – для штаммов аллеля I1-3. Линия I2-1, которая включает большинство «российских» PBA 2-й геногруппы, имеет tMRCA в 1992 г.; линия I2-2, включающая вакцинный штамм *RV5*, – от 1967 г. Аллель I2-3 имеет ближайшего общего предка, датированного 1910 г. (табл. 1).

Эффективный размер популяции. Графики демографической истории, реконструированные на основе нуклеотидных последовательностей гена *VP6* ротавирусов российского происхождения при помощи модели SkyGrid и байесовского анализа, не позволяют выявить различия между штаммами, принадлежащими 1-й и 2-й геногруппам (рис. 2). Обе популяции характеризуются долговременными стабильными показателями. Ротавирусы с генотипом I1 имели тенденцию к незначительному росту N_e , а затем на уровне 2000 г. произошло снижение этого значения. Аналогично PBA с генотипом I2 показали небольшое снижение эффективного размера популяции после этой же временной отметки.

В-клеточные антигенные эпитопы белка VP6. Вакцина *RV1* основана на аттенуированном штамме ротавируса человека с генотипом G1P[8]. Ген *VP6* имеет генотип I1 и относится к 1-й геногруппе. *RV5* является реассортантной пентавалентной вакциной на основе штаммов ротавируса быка и ротавирусов человека. *VP6* в ней относится к бычьему ротавирусу генотипа I2.

Эпитоп А образован 30 аминокислотными остатками (231–260 а.о.). Аминокислотный состав в этом регионе у вакцин *RV1* и *RV5* отличается на 1 аминокислоту в позиции F248Y (рис. 3). Дикие штаммы, изолированные на территории России, отличаются от вакцинных единичными мутациями у отдельных штаммов. В позиции 252 ряд российских образцов (169 из 180 последовательностей), относящихся к 1-й геногруппе, несёт замену V252I. У 2-й геногруппы в этой позиции находится валин (Val), так же как у *RV1* и *RV5*. Данная аминокислотная мутация не связана с принадлежностью к определённой линии или кластеру на филогенетическом дереве.

Эпитоп В состоит из 28 аминокислотных остатков (265–292 а.о.). У вакцин *RV1* и *RV5* состав аминокислот

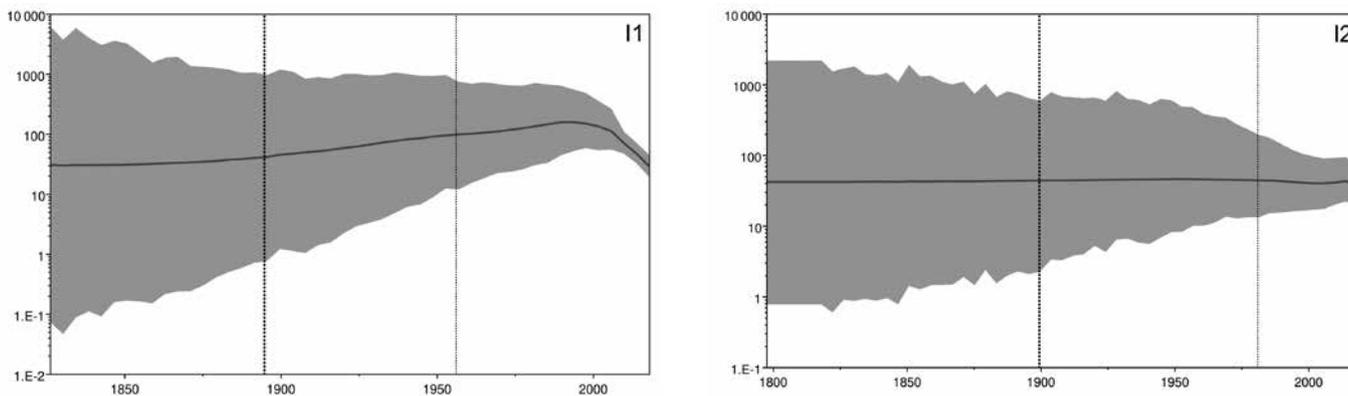


Рис. 2. Демографическая история гена *VP6* генотипов I1 и I2. По оси *x* отложено время в календарных годах. По оси *y* показан эффективный размер популяции вируса (*N_e*), представляющий количество геномов, эффективно способствующих возникновению новых инфекций. Линия в центре отображает медианные значения в рамках 95% интервала заданной плотности.

Fig. 2. Demographic history of the I1 and I2 *VP6* gene. The *x*-axis shows time in calendar years. The *y*-axis shows the effective population size of the virus (*N_e*), representing the number of genomes that are effective for the development of new infections. The line in the center represents median values within 95% of the target density range.

различается в позиции S291L; у обеих в позиции 281 находится изолейцин (Ile), однако у диких штаммов обеих геногрупп наблюдается замена на валин (Val) (38 изолятов генотипа I1 и 26 изолятов I2), также не связанная с филогенетической характеристикой штаммов.

Таким образом, в ходе анализа аминокислотной последовательности *VP6* в области предполагаемых антигенных эпитопов А и В показана высокая консервативность аминокислотного состава как у вакцинных штаммов, так и у штаммов РВА, изолированных на территории России, несмотря на их принадлежность к разным геногруппам.

Таблица 1. Уровень мутаций и время циркуляции ближайшего общего предка, рассчитанные на основе байесовской филогенетической реконструкции

Table 1. Mutation rate and time of the most recent common ancestor calculated based on Bayesian phylogenetic reconstruction

| Генотип (сублиния) Genotype (sublineage) | Уровень мутаций в кластере сублиний, замен/сайт/год Substitution rate in cluster, substitutions/site/year | tMRCA кластера, год (95% HPD) tMRCA of cluster, year (95% HPD) |
|---|--|---|
| I1 | 7,732E-4 | |
| I1-1 | 7.732E-4 | 1983 (1966–1993) |
| I1-2 | 1,098E-3 | 1973 (1952–1988) |
| I1-3 | 9,172E-4 | 1951 (1899–1985) |
| I2 | 1,008E-3 | |
| I2-1 | 1,008E-3 | 1992 (1974–2003) |
| I2-2 | 1,197E-3 | 1967 (1915–1994) |
| I2-3 | 1,058E-3 | 1910 (1795–1981) |

Примечание. HPD – интервал высшей апостериорной плотности.

Note. HPD – highest posterior density interval.

На исследуемой выборке образцов продемонстрированы аминокислотные различия в позициях, специфичных в отношении антител субгрупп I и II: M172A, N305A, Q315E, соответствующие принадлежности к 1-й или 2-й геногруппе. Участки 296–299 и 306 а.о., отвечающие за связывание специфических субгрупповых антител, были консервативны у всех рассмотренных изолятов.

Анализ Т-клеточных эпитопов. Исследование линейных эпитопов на выборке штаммов РВА, изолированных на территории России, позволило выявить лишь единичные мутации штаммов дикого типа по сравнению с вакцинными. Аминокислотные различия в позициях N305A, Q315E, L342M, A348S коррелируют с принадлежностью к 1-й и 2-й геногруппам соответственно. В позиции L291S вакцинный штамм *RV1* несёт лейцин (Leu), тогда как штаммы *RV5* и российские образцы имеют серин (Ser). В целом данные участки высококонсервативны, и точечных мутаций у штаммов российского происхождения нами обнаружено не было (рис. 4).

Обсуждение

Высококонсервативный белок внутреннего капсида вириона *VP6* является как антигенным протеином, так и иммуногеном [13, 22–25]. Его нативная конформация в экспрессированном и очищенном виде представляет собой олигомер. Дальнейшая сборка тримерных молекул в морфологические структуры происходит самопроизвольно; для этого не требуются взаимодействия с другими вирусными белками или субвирусными структурами [26]. Самоорганизующийся *VP6*, индуцирующий иммунный ответ, всё чаще рассматривается в качестве потенциального вакцинного кандидата [27].

В настоящее время отсутствуют отечественные вакцины против РВИ. Производство живых вакцинных препаратов – трудоёмкий, длительный и дорогостоящий процесс с повышенными требованиями к доставке готового препарата до пациента. Другая важная

| Антигенный эпитоп А 231-260 а.о. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Antigenic epitope A 231-260 aa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 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 |
| RV1 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 |
| RV5 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 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I/V | * | * | * | * | * | * | * | * |

| Антигенный эпитоп В 265-292 а.о. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Antigenic epitope B 265-292 aa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 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 | |
| RV1 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 | |
| RV5 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 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

Рис. 3. Аминокислотный состав антигенных эпитопов А (231–260 а.о.) и В (265–292 а.о.) белка VP6, выделенных на территории России ротавирусов дикого типа и штаммов в составе вакцин RV5 и RV1.

Fig. 3. Amino acid composition of antigenic epitopes A (231–260 aa) and B (265–292 aa) of VP6 protein of Russian wild-type rotavirus strains and strains in the RV5 and RV1 vaccines.

| Штамм Strain | Последовательность эпитопа (а.о.) Epitope Sequence (aa) [Wei et al. 2006] | | | | | | | | |
|-----------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 |
| Wa | T | L | L | A | N | V | T | A | V |
| RV1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| RV5 | * | M | * | * | * | * | * | S | * |
| RUS I1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| RUS I2 | * | M | * | * | * | * | * | S | * |

| Штамм Strain | Последовательность эпитопа (а.о.) Epitope Sequence (aa) [Zhao et al. 2008; Parra et al. 2014] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 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/PBA человека RRV/Human RVA | 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 |
| RV1 | * | * | * | * | L | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | N | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Q |
| RV5 | * | * | * | * | L | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| RUS I1 | * | * | * | * | L | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | N | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Q |
| RUS I2 | * | * | * | * | L | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Q |

Рис. 4. Аминокислотные последовательности линейных эпитопов белка VP6 вакцинных штаммов RV1, RV5 и выделенных на территории России PBA дикого типа.

Fig. 4. Amino acid sequences of protein VP6 linear epitopes of vaccine strains RV1, RV5 and Russian wild-type RVA strains.

проблема их использования – безопасность у детей с иммунодефицитами в связи с возможным развитием вакцин-ассоциированного гастроэнтерита, а также риск такого осложнения, как инвагинация кишечника. Одна из новых парадигм заключается в создании нереплицирующихся вакцин, в том числе на основе белка VP6. В связи с этим ряд исследовательских групп как в нашей стране, так и за рубежом работают над созданием рекомбинантных конструкций [28–30].

В настоящей работе впервые дана молекулярно-генетическая характеристика «российских» и вакцинных штаммов ротавируса вида А на основе гена VP6. Для того чтобы оценить эволюционные взаимоотношения между «российскими» ротавирусами дикого типа и штаммами в составе вакцин RV1 и RV5, мы реконструировали филогенетические деревья с использованием байесовской статистики. Проведенный филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена VP6 «российских» PBA

позволил продемонстрировать наличие трех сублиний внутри генотипа I1 (I1-1–I1-3) и 3 – внутри генотипа I2 (I2-1–I2-3). Установлено, что большинство «российских» PBA несут аллели I1-1 и I2-1 гена VP6.

Ранее рядом авторов были получены данные, описывающие скорость накопления мутаций для разных генов ротавируса вида А. Полученные результаты могут варьировать в некоторых пределах, поскольку большое влияние на них оказывают размер выборки и её состав. В нашем исследовании скорость накопления мутаций «российских» PBA генотипа I1 (7,732E-4) незначительно отличалась от этого показателя для I2 (1,008E-3).

Эффективный размер популяции (Ne) – абстрактная величина, позволяющая измерить размер изучаемой конкретной популяции на основе генетического разнообразия в рамках идеализированной модели и реконструировать прошлую популяционную динамику [31]. Этот параметр предоставляет возможность

количественной оценки генетического разнообразия и его временных колебаний на основе исследуемых геномных данных. Анализ эффективного размера популяции может быть использован для ретроспективного установления даты начала эпидемии, а также мониторинга эффективности действий служб и принятых мер по противодействию распространению инфекции [32, 33]. В нашей работе на основе нуклеотидных последовательностей гена *VP6* «российских» ротавирусов показано уменьшение величины N_e для популяции РВА после 2000-х гг., что свидетельствует о снижении генетического разнообразия *VP6*. Эти данные подтверждаются филогенетическим анализом: большинство «российских» ротавирусов дикого типа, изолированных в период 2010–2018 гг., несут аллели I1-1 и I2-1. В кластеры I1-2, I1-3, I2-2, I2-3 входили вакцинные штаммы и не получившие широкого распространения немногочисленные изоляты. В условиях низкого охвата вакцинацией снижение N_e может быть связано в том числе с цикличностью эпидемического процесса, определяемого естественным снижением активности циркуляции доминирующего типа, что было показано ранее на примере нижегородской популяции РВА [34].

Многочисленные работы посвящены сравнительному анализу области нейтрализующих эпитопов белков *VP7* и *VP4* у РВА, изолированных на разных территориях, и вакцинных штаммов *RV1* и *RV5* [35–37]. Однако подобные исследования не проводятся в отношении белка *VP6*, в связи с чем мы провели сравнение аминокислотного состава области антигенных эпитопов белка *VP6* штаммов в составе *RV1* и *RV5* и ротавирусов, изолированных на территории РФ после 2010 г. Анализ аминокислотного состава в области антигенных эпитопов *VP6* указывает на высокую консервативность антигенных детерминант у вакцинных штаммов и штаммов дикого типа, изолированных на территории РФ, несмотря на разницу во времени их выделения. Высокая консервативность показана у ротавирусов, относящихся к 1-й и 2-й геногруппам, которые доминируют среди изолированных от человека РВА. Выявленные аминокислотные различия у белка *VP6*, по всей вероятности, связаны с генотиповой принадлежностью штамма и не затрагивают его иммунологические свойства. Это наблюдение, с одной стороны, делает протеин *VP6* удобной моделью для разработки вакцин; в то же время значимость его в формировании стойкого протективного иммунитета окончательно не установлена.

Заключение

Таким образом, на основе анализа филодинамических характеристик нуклеотидных последовательностей гена *VP6*, изучения выведенных последовательностей аминокислот в области антигенных эпитопов продемонстрирована высокая консервативность белка внутреннего капсида вириона, что потенциально делает его перспективной моделью для разработки универсальной ротавирусной вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Steele A.D., Duque J., Parashar U.D. 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. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(2): 136–41. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5).
2. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнёва Е.А., Федосеенко М.В., Селимзянова Л.Р. и др. Ротавирусная инфекция у детей – нерешённая проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике. *Педиатрическая фармакология.* 2017; 14(4): 248–57. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756>.
3. Mirzayeva R., Cortese M.M., Mosina L., Biellik R., Lobanov A., Chernyshova L., et al. 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. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (Suppl. 2): S203–14. <https://doi.org/10.1086/605041>.
4. Ward R.L., Bernstein D.I. Rotarix: A rotavirus vaccine for the world. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(2): 222–8. <https://doi.org/10.1086/595702>.
5. Ciarlet M., Schödel F. Development of a rotavirus vaccine: Clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine.* 2009; 27(Suppl. 6): G72–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.107>.
6. Glass R.I., Bhan M.K., Ray P., Bahl R., Parashar U.D., Greenberg H., et al. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(Suppl. 1): S30–5. <https://doi.org/10.1086/431498>.
7. Naik S.P., Zade J.K., Sabale R.N., Pisal S.S., Menon R., Bankar S.G., et al. Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASILL®). *Vaccine.* 2017; 35(22): 2962–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.025>.
8. Greenberg H.B., Flores J., Kalica A.R., Wyatt R.G., Jones R. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 1983; 64 (Pt. 2): 313–20. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-2-313>.
9. Iturriza Gómara M., Wong C., Blome S., Desselberger U., Gray J. Molecular characterization of *VP6* genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 2002; 76(13): 6596–601. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002>.
10. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2013: 1347–401.
11. Nagashima S., Kobayashi N., Ishino M., Alam M.M., Ahmed M.U., Paul S.K., et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J. Med. Virol.* 2008; 80(11): 2023–33. <https://doi.org/10.1002/jmv.21286>.
12. López S., Espinosa R., Greenberg H.B., Arias C.F. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein *VP6*. *Virology.* 1994; 204(1): 153–62. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1519>.
13. Tang B., Gilbert J.M., Matsui S.M., Greenberg H.B. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology.* 1997; 237(1): 89–96. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8762>.
14. Aiyegbo M.S., Sapparapu G., Spiller B.W., Eli I.M., Williams D.R., Kim R., et al. Human rotavirus *VP6*-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One.* 2013; 9(8): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061101>.
15. Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018; 4(1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
16. Husemann M., Zachos F.E., Paxton R.J., Habel J.C. Effective population size in ecology and evolution. *Heredity.* 2016; 117(4): 191–2. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.75>.
17. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

18. Rambaut A., Lam T.T., Max Carvalho L., Pybus O.G. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016; 2(1): vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>.

19. Ayres D.L., Cummings M.P., Baele G., Darling A.E., Lewis P.O., Swofford D.L., et al. BEAGLE 3: improved performance, scaling and usability for a high-performance computing library for statistical phylogenetics. *Syst. Biol.* 2019; 68(6): 1052–61. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syz020>.

20. Hill V., Baele G. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the Skygrid coalescent model. *Mol. Biol. Evol.* 2019; 36(11): 2620–8. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz172>.

21. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 2018; 67(5): 901–4. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy03>.

22. Svensson L., Sheshberadaran H., Vene S., Norrby E., Grandien M., Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J. Gen. Virol.* 1987; 68(Pt. 3): 643–51. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-3-643>.

23. Svensson L., Sheshberadaran H., Vesikari T., Norrby E., Wadell G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J. Gen. Virol.* 1987; 68(Pt. 7): 1993–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-7-1993>.

24. Ishida S., Feng N., Tang B., Gilbert J.M., Greenberg H.B. Quantification of systemic and local immune responses to individual rotavirus proteins during rotavirus infection in mice. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(7): 1694–700. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.7.1694-1700.1996>.

25. Colomina J., Gil M.T., Codoñer P., Buesa J. Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection. *J. Med. Virol.* 1998; 56(1): 58–65. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199809\)56:1<58::aid-jmv10>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199809)56:1<58::aid-jmv10>3.0.co;2-s).

26. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49.

27. Afchangi A., Jalilvand S., Mohajel N., Marashi S.M., Shoja Z. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate. *Rev. Med. Virol.* 2019; 29(2): e2027. <https://doi.org/10.1002/rmv.2027>.

28. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Фёдорова Е.А., Симбирцев А.С. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. *Медицинская иммунология.* 2016; 18(5): 417–24. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>.

29. Choi A.H., McNeal M.M., Basu M., Flint J.A., Stone S.C., Clements J.D., et al. 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. *Vaccine.* 2002; 20(27-28): 3310–21. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00315-8).

30. McNeal M.M., Basu M., Bean J.A., Clements J.D., Lycke N.Y., Ramne A., et al. Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge. *Vaccine.* 2007; 25(33): 6224–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.065>.

31. Gill M.S., Lemey P., Faria N.R., Rambaut A., Shapiro B., Suchard M.A. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(3): 713–24. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss265>.

32. Faria N.R., Suchard M.A., Abecasis A., Sousa J.D., Ndembu N., Camacho R.J., et al. Phylogenetics of the HIV-1 CRF02_AG clade in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(2): 453–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.028>.

33. Rambaut A., Pybus O.G., Nelson M.I., Viboud C., Taubenberger J.K., Holmes E.C. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature.* 2008; 453(7195): 615–9. <https://doi.org/10.1038/nature06945>.

34. Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Фёдорова О.Ф. Цикличность эпидемического процесса ротавирусного гастроэнтерита и ее причины. В кн.: *Материалы научной конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний»*. Н. Новгород; 2004: 74–7.

35. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and

VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>.

36. Morozova O.V., Sashina T.A., Fomina S.G., Novikova N.A. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. *Arch. Virol.* 2015; 160(7): 1693–703. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2439-6>.

37. Motamedi-Rad M., Farahmand M., Arashkia A., Jalilvand S., Shoja Z. 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. *J. Med. Virol.* 2020; 92(8): 1110–23. <https://doi.org/10.1002/jmv.25642>

REFERENCES

1. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Steele A.D., Duque J., Parashar U.D. 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. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(2): 136–41. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5).
2. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishnyova E.A., Fedoseenko M.V., Selimzyanova L.R., et al. Rotavirus infection in children is an unsolved problem. Review of guidelines for vaccinal prevention. *Obzor rekomendatsiy po vaksinoprofilaktike. Peditricheskaya farmakologiya.* 2017; 14(4): 248–57. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756> (in Russian).
3. Mirzayeva R., Cortese M.M., Mosina L., Biellik R., Lobanov A., Chernyshova L., et al. 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. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (Suppl. 2): S203–14. <https://doi.org/10.1086/605041>.
4. Ward R.L., Bernstein D.I. Rotarix: A rotavirus vaccine for the world. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(2): 222–8. <https://doi.org/10.1086/595702>.
5. Ciarlet M., Schödel F. Development of a rotavirus vaccine: Clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine.* 2009; 27(Suppl. 6): G72–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.107>.
6. Glass R.I., Bhan M.K., Ray P., Bahl R., Parashar U.D., Greenberg H., et al. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(Suppl. 1): S30–5. <https://doi.org/10.1086/431498>.
7. Naik S.P., Zade J.K., Sabale R.N., Pisal S.S., Menon R., Bankar S.G., et al. Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIIL®). *Vaccine.* 2017; 35(22): 2962–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.025>.
8. Greenberg H.B., Flores J., Kalica A.R., Wyatt R.G., Jones R. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 1983; 64 (Pt. 2): 313–20. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-2-313>.
9. Iturriza Gómara M., Wong C., Blome S., Desselberger U., Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 2002; 76(13): 6596–601. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002>.
10. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2013: 1347–401.
11. Nagashima S., Kobayashi N., Ishino M., Alam M.M., Ahmed M.U., Paul S.K., et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J. Med. Virol.* 2008; 80(11): 2023–33. <https://doi.org/10.1002/jmv.21286>.
12. López S., Espinosa R., Greenberg H.B., Arias C.F. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology.* 1994; 204(1): 153–62. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1519>.
13. Tang B., Gilbert J.M., Matsui S.M., Greenberg H.B. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology.* 1997; 237(1): 89–96. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8762>.

14. Aiyegbo M.S., Sapparapu G., Spiller B.W., Eli I.M., Williams D.R., Kim R., et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*. 2013; 9(8): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061101>.
15. Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018; 4(1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
16. Husemann M., Zachos F.E., Paxton R.J., Habel J.C. Effective population size in ecology and evolution. *Heredity*. 2016; 117(4): 191–2. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.75>.
17. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
18. Rambaut A., Lam T.T., Max Carvalho L., Pybus O.G. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016; 2(1): vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>.
19. Ayres D.L., Cummings M.P., Baele G., Darling A.E., Lewis P.O., Swofford D.L., et al. BEAGLE 3: improved performance, scaling and usability for a high-performance computing library for statistical phylogenetics. *Syst. Biol.* 2019; 68(6): 1052–61. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syz020>.
20. Hill V., Baele G. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the Skygrid coalescent model. *Mol. Biol. Evol.* 2019; 36(11): 2620–8. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz172>.
21. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 2018; 67(5): 901–4. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy03>.
22. Svensson L., Sheshberadaran H., Vene S., Norrby E., Grandien M., Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J. Gen. Virol.* 1987; 68(Pt. 3): 643–51. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-3-643>.
23. Svensson L., Sheshberadaran H., Vesikari T., Norrby E., Wadell G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J. Gen. Virol.* 1987; 68(Pt. 7): 1993–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-7-1993>.
24. Ishida S., Feng N., Tang B., Gilbert J.M., Greenberg H.B. Quantification of systemic and local immune responses to individual rotavirus proteins during rotavirus infection in mice. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(7): 1694–700. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.7.1694-1700.1996>.
25. Colomina J., Gil M.T., Codoñer P., Buesa J. Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection. *J. Med. Virol.* 1998; 56(1): 58–65. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199809\)56:1<58::aid-jmv10>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199809)56:1<58::aid-jmv10>3.0.co;2-s).
26. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49.
27. Afchangi A., Jalilvand S., Mohajel N., Marashi S.M., Shoja Z. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate. *Rev. Med. Virol.* 2019; 29(2): e2027. <https://doi.org/10.1002/rmv.2027>.
28. Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fyodorova E.A., Simbirtsev A.S. Protective activity study of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein FliCVP6VP8. *Meditsinskaya immunologiya*. 2016; 18(5): 417–24. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424> (in Russian).
29. Choi A.H., McNeal M.M., Basu M., Flint J.A., Stone S.C., Clements J.D., et al. 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. *Vaccine*. 2002; 20(27–28): 3310–21. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00315-8).
30. McNeal M.M., Basu M., Bean J.A., Clements J.D., Lycke N.Y., Ramme A., et al. Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge. *Vaccine*. 2007; 25(33): 6224–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.065>.
31. Gill M.S., Lemey P., Faria N.R., Rambaut A., Shapiro B., Suchard M.A. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(3): 713–24. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss265>.
32. Faria N.R., Suchard M.A., Abecasis A., Sousa J.D., Ndembu N., Camacho R.J., et al. Phylodynamics of the HIV-1 CRF02_AG clade in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(2): 453–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.028>.
33. Rambaut A., Pybus O.G., Nelson M.I., Viboud C., Taubenberger J.K., Holmes E.C. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*. 2008; 453(7195): 615–9. <https://doi.org/10.1038/nature06945>.
34. Novikova N.A., Epifanova N.V., Fyodorova O.F. Cyclical nature of the epidemic process of rotavirus gastroenteritis and its causes. In: *Proceedings of the Scientific Conference «New Technologies in the Prevention, Diagnosis, Surveillance and Treatment of Infectious Diseases» [Materialy nauchnoy konferentsii «Novye tekhnologii v profilaktike, diagnostike, epidnadzore i lechenii infektsionnykh zabolevaniy»]*. Nizhniy Novgorod; 2004: 74–7 (in Russian).
35. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>.
36. Morozova O.V., Sashina T.A., Fomina S.G., Novikova N.A. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. *Arch. Virol.* 2015; 160(7): 1693–703. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2439-6>.
37. Motamedi-Rad M., Farahmand M., Arashkia A., Jalilvand S., Shoja Z. 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. *J. Med. Virol.* 2020; 92(8): 1110–23. <https://doi.org/10.1002/jmv.25642>.