

На правах рукописи

Файзулов Евгений Бахтиерович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ
ВИРУСОВ - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫХ ИНФЕКЦИЙ**

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва

2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Научный консультант:

Зверев Виталий Васильевич – доктор биологических наук, профессор, академик РАН.

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, начальник Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Гребенникова Татьяна Владимировна – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель Испытательного центра, руководитель лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Зарубаев Владимир Викторович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии Федерального государственного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ___ час. на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и на сайте <https://chumakovs.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективной мерой снижения заболеваемости и смертности от вирусных инфекций. Благодаря вакцинации в глобальном масштабе была ликвидирована натуральная оспа и сведена к минимуму заболеваемость полиомиелитом, корью, эпидемическим паротитом и краснухой, что свидетельствует о принципиальной возможности элиминации этих заболеваний. В то же время, опыт массового применения вакцин против ротавирусного энтерита, папилломавирусных заболеваний и COVID-19 показал, что вакцинация защищает человека от тяжелых форм этих заболеваний, но не всегда предохраняет от инфекции и не предотвращает распространения вируса. Возбудителей перечисленных вирусных инфекций характеризует широкое генетическое разнообразие, тенденция к появлению новых антигенных вариантов и дивергенция в процессе эволюции под влиянием различных селективных факторов. Способность к периодическому появлению новых эпидемически значимых геновариантов вирусов определяется высокой изменчивостью вирусного генома, наличием природных резервуаров инфекции, возможностью межвидовой трансмиссии, а для ротавирусов группы А еще и сегментированным характером вирусного генома. Актуальность диссертации определяется высокой клинической значимостью и убиквитарностью коронавирусов, папилломавирусов и ротавирусов группы А, а также отсутствием соответствующих вакцин в российском национальном календаре иммунизации (НКИ). Важно отметить, что в соответствии с рекомендациями ВОЗ, ротавирусная и папилломавирусная инфекция относятся к приоритетным вакциноуправляемым инфекциям, при этом соответствующие отечественные профилактические вакцины не разработаны, либо находятся на стадии клинических исследований.

Возможность появления новых патогенных вирусов, в том числе обладающих пандемическим потенциалом, требует от служб эпидемиологического надзора и медицинской науки быть в состоянии постоянной готовности к быстрой разработке средств диагностики, профилактики и лечения новых инфекций. Уже в XXI веке мир столкнулся с такими угрозами, как пандемии гриппа А/Н1N1 (2009-2010) и COVID-19 (2020-2023), риск всемирного распространения вирусов гриппа птиц (А/Н5N1, А/Н7N9, А/Н3N8 и другие подтипы), коронавирусов SARS-CoV-1 (2003) и MERS-CoV (с 2012 г. по настоящее время), вируса оспы обезьян (с 2022 г. по настоящее время) и ряда других вирусов (Gorbalenya A., 2020; Zhang X.-Y., 2020; Kang M., 2024; Hirani R. 2023; Morens D.M., 2020). Высока вероятность появления геновариантов вирусов, «ускользающих» от естественного и поствакцинального иммунитета, специфических противовирусных препаратов и средств этиологической диагностики, что обуславливает необходимость мониторинга генетического и

антигенного разнообразия возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций.

Не менее актуальной проблемой фундаментальной и медицинской вирусологии является установление факторов и детерминант вирулентности вирусов и механизмов ее модуляции. Эти знания имеют большое научно-практическое значение для создания живых аттенуированных вакцин (ЖАВ), способных активировать не только системный гуморальный и клеточный иммунитет, но также и местный мукозальный иммунитет, обеспечивая стойкий иммунный ответ и перекрестную защиту от разных антигенных вариантов вирусов. Важно отметить, что вакцина против краснухи, применяемая в рамках НКИ, основана на зарубежном вакцинном штамме Wistar RA27/3. Кроме того, несмотря на то, что в мире проводятся соответствующие научные исследования, спустя более чем четыре года с начала пандемии потенциал ЖАВ в профилактике COVID-19 остается нереализованным. В связи с этим, актуальными проблемами российского здравоохранения остается создание отечественных ЖАВ против таких вирусных заболеваний, как краснуха и COVID-19.

Степень разработанности темы исследования

Последние десятилетия XX века ознаменовались бурным развитием методов молекулярной биологии и генной инженерии, многие из которых прочно вошли в практику вирусологических исследований (Burrell C.J., 2017). Особую практическую ценность молекулярные методы исследования представляют для характеристики возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций, поскольку получаемые данные могут быть использованы для решения задач, связанных с контролем распространения этих заболеваний.

Традиционный подход к созданию ЖАВ заключается в получении мутантов вируса путём его длительного пассирования в культуре клеток в селективных условиях, например, при пониженной температуре и/или в клетках другого хозяина (вакцины против гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита, полиомиелита, ветряной оспы) (Maassab H.F., 1985; Minor P.D., 2015; Plotkin S.A., 2003; Sabin A.V., 1985). На современном этапе для аттенуации вируса все чаще используют методы генной инженерии и обратной генетики, позволяющие целенаправленно изменять геном вируса, «выключая» геномные детерминанты вирулентности вирусов, либо снижая эффективность процессов транскрипции вирусного генома или трансляции вирусной РНК (модификация промоторов вирусных генов, деоптимизация кодонов) (Stobart C.C., 2014; Martinez-Sobrido L., 2020). Несмотря на достигнутый прогресс в «управлении» вирулентностью вирусов, в процессе разработки и применения живых вирусных вакцин сохраняются проблемы. Получение вакцинного штамма требует не только глубоких знаний биологии возбудителя, его антигенного разнообразия и взаимоотношений с хозяином на уровнях *in vitro* и *in vivo*, но и тщательных

эмпирических доказательств его безопасности, иммуногенности, протективной активности и стабильности аттенуационного фенотипа и генотипа.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационного исследования – оценка генетического разнообразия возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций и создание научной основы для оптимизации профилактических вирусных вакцин.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. На основе мультиплексных реакций обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) разработать тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций (ОРВИ и ОКИ), включая вирусы гриппа А и В (ВГрА и ВГрВ), вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4 типов (ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4), аденовирусы (АДВ), бокавирусы (БВ), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), риновирусы (РВ), энтеровирусы (ЭВ), коронавирусы (КВ), ротавирусы групп А и С (РВА и РВС), норовирусы (НВ), саповирусы (СВ), астровирусы (АВ), полиовирусы (ПВ), вирусы гепатита А и Е (ВГА и ВГЕ), ортореовирусы млекопитающих (ОРВ), вирус краснухи.

2. Разработать на основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и нанопорового секвенирования (НПС) методические подходы к генетической характеристике ротавирусов группы А человека.

3. Исследовать распространенность разных G/P-генотипов ротавирусов группы А человека, циркулирующих на территории московского региона.

4. Исследовать распространенность разных генотипов папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска на территории Российской Федерации (РФ).

5. Исследовать видовое разнообразие коронавирусов человека, циркулирующих на территории московского региона.

6. Выявить вероятные генетические и фенотипические маркеры аттенуации холодаадаптированного (*ca*, cold-adapted) варианта штамма С-77 вируса краснухи, полученного ранее в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

7. Получить *ca* мутанты коронавируса SARS-CoV-2 и определить вероятные генетические и фенотипические маркеры их аттенуации.

8. На животной модели COVID-19 оценить вирулентность, иммуногенность и протективную активность *ca* мутантов SARS-CoV-2.

Научная новизна исследования

1. Разработана не имеющая аналогов методика специфической ПЦР-амплификации сегментированного ротавирусного РНК-генома для последующей полногеномной характеристики ротавирусов человека методом нанопорового

секвенирования. Экспериментально обоснована высокая эффективность предложенного подхода для генетической характеристики штаммов ротавирусов, относящихся к разным эволюционным линиям (Wa-, DS-1- и AU-1-подобные).

2. Установлена ключевая роль ротавирусов группы А в госпитализации с острым гастроэнтеритом и внутрибольничного заражения в период с 2009 по 2014 гг. детей в возрасте до 5 лет в условиях стационаров г. Москвы. Определена динамическая структура G/P-генотипов ротавирусов группы А человека, циркулировавших в московском регионе в период с 2009 по 2020 гг. Показано, что в период 2009-2014 гг. доминирующим генотипом являлся G4P[8], выявленный в 48,2% случаев, тогда как частота выявления генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] была значительно ниже и варьировала от 14,7% до 4,1%. В период с 2015 по 2020 гг. в регионе снизилась частота встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%) и выросла доля генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%) по сравнению с периодом 2009-2014 гг. В период с 2018 по 2020 гг. выявлена циркуляция не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного РВА G3P[8]I2 (более 20%), широко распространившегося в мире в последние годы. Для штамма с генотипом G4P[6]I1 установлена тесная филогенетическая связь с ротавирусами свиней.

3. Получены приоритетные данные о циркуляции на территории РФ всех известных сезонных коронавирусов человека - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), Human coronavirus 229E (HCoV-229E), Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) и Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1). Установлено, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

4. В геноме аттенуированного мутанта штамма С-77 вируса краснухи выявлен набор мутаций, возникших в процессе культивирования и адаптации вируса к новому хозяину (культура клеток почки обезьян Vero) и росту при пониженной температуре (33°C), определяющие его *sa* и аттенуационный (*att*, *attenuative*) фенотип. В том числе, выявлено 4 уникальные аминокислотные замены - Tyr1042Cys и Ser1106Thr в протеазном домене открытой рамки считывания (ORF) неструктурных белков и Leu27Phe и Ala564Thr в доменах ORF С-белка и Е2-белка, соответственно, роль которых в аттенуации штамма С-77 представляется ключевой.

5. Путем холодной адаптации в культуре клеток почки обезьяны Vero получены не имеющие отечественных аналогов аттенуированные мутанты Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 Dubrovka. На основе вирусологических и молекулярно-биологических методов разработаны подходы к оценке генетической и фенотипической стабильности аттенуированных мутантов, заключающиеся в определении у них набора мутаций, ответственных за проявление аттенуационного фенотипа, и выявлении *in vitro* наличия *sa* и

температурочувствительного (*ts*, temperature sensitive) фенотипа и способности заражать клетки легких человека. На животной модели коронавирусной пневмонии установлена высокая иммуногенность и протективная активность *sa* вариантов SARS-CoV-2. Таким образом, разработаны научные основы аттенуации SARS-CoV-2 и получения кандидатных вакцинных штаммов для создания ЖАВ против COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость работы

Дано экспериментальное обоснование высокой диагностической эффективности применения метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций. На основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ разработаны экспериментальные тест-системы для этиологической диагностики ОРВИ и ОКИ и генотипирования ротавирусов группы А. Разработанные тест-системы могут применяться как в научных исследованиях, так и для быстрой расшифровки вспышек ОРВИ и ОКИ и эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций. Способы дифференциальной диагностики ОРВИ и ОКИ, нуклеотидные последовательности диагностических олигонуклеотидов защищены патентами РФ RU2460803C2 и RU2506317C2. Набор реагентов «ОРВИ-Монитор» приказом Росздравнадзора от 19 марта 2012 года № 1211-Пр/12 разрешен к производству, продаже и применению на территории РФ (РУ № ФСР 2012/13218).

Разработанные методические подходы к генетической характеристике ротавирусов представляют собой эффективные инструменты эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции, а также могут быть использованы для контроля подлинности и специфической активности при производстве ротавирусной вакцины. Полученные данные о генетической структуре ротавирусов, выявляемых на обследуемой территории, представляют ценность при выработке рекомендаций по составу отечественной ротавирусной вакцины. Анализ разнообразия циркулирующих геновариантов ротавирусов позволил установить важную роль ротавирусов животных и межвидовой передачи в появлении патогенных для человека ротавирусов, имеющих эпидемический потенциал.

В исследовании разнообразия сезонных коронавирусов человека, циркулирующих в московском регионе, подтвержден тезис об убиквитарности коронавирусов HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. Установлена этиологическая роль коронавирусов HCoV-OC43 и HCoV-NL63 в возникновении у детей в возрасте до 5 лет тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

В России вакцинопрофилактика папилломавирусной инфекции проводится зарубежными вакцинными препаратами. В связи с этим, проведенное

исследование распространенности ранних генотипов папилломавирусов человека (ВПЧ) на территории РФ важно для прогнозирования эффективности специфической профилактики папилломавирусных заболеваний вакцинами разного состава, а также для разработки отечественных ВПЧ-вакцин с учетом региональных особенностей.

На различных этапах пандемии из клинических образцов от пациентов с COVID-19 получены изоляты SARS-CoV-2 и установлена их субвидовая таксономическая принадлежность к разным эпидемически значимым вариантам вируса, включая Ухань-, Delta- и Omicron-подобные варианты. Охарактеризованные культуральные изоляты SARS-CoV-2 представляют ценность при проведении вирусологических исследований, а также при разработке средств диагностики, специфической профилактики и лечения COVID-19.

Определены факторы и маркеры аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2. Установлено, что эти вирусы в процессе культивирования и адаптации к новому хозяину (клетки почки обезьяны Vero) и росту при пониженной температуре приобретают *att* фенотип, детерминируемый рядом уникальных мутаций, не встречающихся у диких штаммов вируса. Показано, что наличие *ts* фенотипа является не единственным условием для аттенуации SARS-CoV-2, поскольку в снижении вирулентности вируса важную роль играет также смена хозяина, которая приводит к утрате мутантным вирусом способности заражать клетки легких человека *in vitro*. Полученные результаты демонстрируют, что холодовая адаптация вирусов краснухи и SARS-CoV-2, проводимая в клетках почки обезьяны Vero, является эффективной стратегией аттенуации этих вирусов. Разработаны методические подходы к выявлению маркеров аттенуации упомянутых вирусов в условиях *in vitro*, которые могут быть использованы в дальнейшем для контроля стабильности фенотипа и генотипа вакцинных штаммов вируса в технологии производства ЖАВ. Таким образом, разработаны принципы получения аттенуированных штаммов вирусов краснухи и SARS-CoV-2, которые по своим биологическим и иммунологическим свойствам могут рассматриваться как кандидатные вакцинные штаммы.

В процессе выполнения диссертации было получено и депонировано в базе данных GenBank 160 полных или частичных последовательностей геномов вирусов краснухи, ротавирусов группы А, коронавируса SARS-CoV-2.

Методология и методы исследования

В работе использованы вирусологические, молекулярно-биологические, иммунохимические, гистологические и статистические методы. Работа носит комплексный и междисциплинарный характер.

Положения, выносимые на защиту

1. В период с 2009 по 2014 гг. основной причиной госпитализации с острым гастроэнтеритом в стационары г. Москвы и внутрибольничной кишечной инфекции у детей в возрасте до 5 лет являлись ротавирусы группы А. Основными тенденциями изменений генетической структуры ротавирусов, циркулировавших в регионе в период 2009 по 2020 гг., было снижение частоты встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%), увеличение доли генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%), а также появление и распространение в период 2018-2020 гг. не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного ротавируса с генотипом G3P[8]I2 (до 24%). Важную роль в возникновении эпидемически значимых вариантов ротавирусов человека играют ротавирусы животного происхождения.

2. На территории РФ циркулируют и широко представлены папилломавирусы высокого онкогенного риска ВПЧ16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 и низкого онкогенного риска ВПЧ6, 11, 44. Доминирующими в структуре выявленных случаев ВПЧ-инфекции являются ВПЧ16 - 13,8%, ВПЧ6 - 10,7%, ВПЧ51 - 6,8%, ВПЧ44 - 6,8%, ВПЧ53 - 6,3%, ВПЧ31 - 5,6%, ВПЧ56 - 5,5%, ВПЧ52 - 5,4%.

3. На территории московского региона циркулируют коронавирусы человека HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. У детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

4. Обладающий *sa* фенотипом мутант штамма С-77 вируса краснухи в процессе холодовой адаптации в клетках нового хозяина приобрел 13 нуклеотидных замен, из которых 6 несинонимичных, в том числе 4 уникальных, которые играют ключевую роль в приобретении вирусом *sa* и *att* фенотипа. *Sa* вариант штамма С-77 по своим биологическим свойствам может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной вакцины против краснухи.

5. Адаптация SARS-CoV-2 к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной температуре (+23°C) приводит к его аттенуации. В снижении вирулентности вируса важную роль играет как приобретение им *ts* фенотипа, так и адаптация к размножению в клетках нового хозяина, сопряженная со снижением инфекционности вируса по отношению к клеткам человека.

6. Холодовая адаптация SARS-CoV-2 в культуре клеток почки обезьян Vero является эффективной стратегией получения аттенуированных штаммов вируса, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью. Однократная интраназальная иммунизация золотистых сирийских хомячков *sa* мутантами SARS-CoV-2 вызывает сероконверсию с выработкой вируснейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции

и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении вирулентным штаммом.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключался в разработке методологии, планировании, организации и проведении экспериментальных исследований, систематизации и анализе полученных результатов, оформлении результатов в виде публикаций и научных докладов. Основная часть экспериментальных работ была выполнена в лаборатории прикладной вирусологии на базе отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. При написании разделов диссертации 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2.3, 3.3.1 использованы материалы шести кандидатских диссертаций по специальности 1.5.10. Вирусология, выполненных в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова под научным руководством и при личном участии Файзулова Е.Б., включая диссертации Оксанича А.С. (2008), Никоновой А.А. (2008), Лободанова С.А. (2013), Аммура Ю.И. (2012), Дмитриева Г.В. (2012), Бахтоярова Г.Н. (2016).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, проверкой воспроизводимости результата в независимых экспериментах, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Материалы диссертационного исследования были доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на заседаниях Ученого совета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и Научной экспертной комиссии ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

По материалам диссертации сделано более 30 докладов на российских и международных научных конференциях и конгрессах, в том числе: II Российский конгресс по медицинской микробиологии и инфектологии (29 февраля - 1 марта 2024 г., Москва); IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (12–13 октября 2023 г., Москва); XII Съезд ВНПОЭНП (26–28 октября 2022 г., Москва); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (7 - 8 октября 2021 г., Москва); X Юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2021» (09-11 ноября 2021 г., Москва); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная

диагностика и биобезопасность – 2020» (6–8 октября 2020 г., Москва); 5 Российский конгресс лабораторной медицины (11-13 сентября 2019 г., Москва); VI Международная конференция, посвященная Дню ДНК-2019 «Современные биотехнологии для науки и практики» (25-26 апреля 2019 г., Санкт-Петербург); Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018» (27-28 сентября 2018 г., Минск); European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (26-30 мая 2018 г., Мюнхен, Германия); IX Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика - 2017» (18-20 апреля 2017 г., Москва); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (18-20 марта 2014 г., Москва); 6th European Congress of Virology (19-22 октября 2016 г., Гамбург, Германия); VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием (30 марта - 1 апреля 2015 г., Москва) и другие.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 35 научных работ, из них статей, опубликованных в Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК), а также индексируемых в международных базах Scopus, Springer, RSCI - 33. Получено патентов на изобретение РФ – 2.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют направлениям исследований: пунктам 6, 7, 10 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Структура и объем работы

Диссертационная работа включает введение, три главы основной части, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, 2 приложения. Работа изложена на 305 страницах, содержит 61 рисунок, 46 таблиц, 640 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 Вирусы

При разработке экспериментальных ПЦР-тест-систем использован генетический материал лабораторных штаммов вирусов гриппа А и В разных подтипов; РСВ (штамм Long); энтеровирусов (эховирусы 3, 6, 7, 30 типов, Коксаки В); полиовирусов 1, 2, 3 типов (вакцинные штаммы Сэбина); вирусов парагриппа (ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4); аденовирусов (АДВ 2, 3, 5, 7, 8 типа); риновирусов А (Rhinovirus А 2, 14, 15, 16, 20, 59 типа) и риновирусов В (Rhinovirus В 14, 17 70, 72, 86 типа); коронавируса человека (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63); вируса краснухи (штаммы Wistar RA 27/3 и С-77); орторевовирусов 1 типа (штамм Lang), 2 типа (штамм Д-5, Jones), 3 типа (штамм Dearing); ротавирусов группы А – штаммы Wa (G1P[8]), DS-1 (G2P[4]), 568 (G3P[3]), HRV-248 (G4P[4]), WI-61 (G9P[8]); вакцинного штамма вируса гепатита А HAS-15.

Для выявления маркеров аттенуации вируса краснухи использован штамм вируса краснухи С-77 и два его *са* мутанта (*са39* и *са46*), полученные ранее в ГУ НИИ вирусных препаратов им. О.Г. Анджaparидзе д.м.н. Р.Г. Десятковой, и вакцинный штамм вируса краснухи Wistar RA 27/3.

В исследовании биологических и иммуногенных свойств *са* мутантов SARS-CoV-2 использованы авторские штаммы нового коронавируса, в том числе Ухань-подобный штамм Dubrovka (D) (GenBank ID MW514307.1), и его *са* мутанты D-B4 (GenBank ID ON059701.1) и D-D2 (GenBank ID ON040961.1), штаммы Podolsk (GenBank ID ON032860.1, Delta), Otradnoe (GenBank ID ON032857.1, Omicron, BA.1.1), FEB2 (GenBank ID ON032857.1, Omicron, BA.5.2).

1.2 Панели клинических образцов и изолятов вирусов

При апробации лабораторных ПЦР тест-систем на основе мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ было проанализировано 815 клинических назальных образцов и 750 фекальных образцов, полученных в период 2007 по 2020 гг. от пациентов с симптомами ОРВИ и ОКИ из лечебно-профилактических учреждений г. Москвы и Московской области. Кроме того, использован генетический материал более 130 культуральных изолятов ЭВ и АДВ, полученных из ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), и контрольные панели зашифрованных образцов QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Великобритания): Influenza virus A & B, Human Metapneumovirus & RSV, Parainfluenza virus, Rhinovirus & Coronavirus, Adenovirus DNA, Norovirus RNA, Enterovirus/Parechovirus RNA (2010).

При исследовании генетического разнообразия папилломавирусов человека были использованы урогенитальные соскобы от пациентов разного пола и

возраста, у которых врач заподозрил ВПЧ-инфекцию (n=12945), собранные в период с января по декабрь 2019 г. от пациентов, проживающих в разных федеральных округах РФ (всех, кроме Дальневосточного ФО).

1.3 Клеточные линии

В работе использовали перевиваемые линии клеток различного происхождения: клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), эпителиальной карциномы гортани человека (HEp-2), рабдомиосаркомы человека (RD), почки собаки (MDCK), почки обезьяны (MA-104), почки африканской зеленой мартышки (Vero), карциномы легких человека Calu-3, почки кролика (RK-13).

1.4 Животные

Для моделирования коронавирусной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, использовали самок золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*, далее - хомячки) SPF массой 40-50 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН, Россия).

1.5 Основные методы

Аденовирусы размножали в культуре клеток HeLa; вирус Коксаки В и полиовирусы – HEp-2; эховирусы - RD; вирусы гриппа А и В - MDCK; РСВ и ротавирусы – MA-104; ВПГ 2 и 3 типов – Vero; SARS-CoV-2 - Vero CCL-81 и Calu-3, вирус краснухи - RK-13 и Vero. Вирусы титровали в чувствительных культурах клеток по конечной точке ЦПД, рассчитывали титр вируса (Reed L.J., 1938; Ramakrishnan M.A., 2016) и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Анализ вирусных геномов и подбор последовательностей праймеров и зондов проводили с помощью компьютерных программ FastPCR professional v. 6.1.32.beta3 («PrimerDigital Ltd.», Финляндия), Omega v. 2.0 («Oxford Molecular Ltd.», США) и Vector NTI Advance v. 9.0 («InforMax Inc.», США), MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), а также Интернет-программы BLAST (NCBI, США). В работе использовали специфические олигонуклеотиды как собственного дизайна, так и полученные из научной литературы.

Генотипирование ВПЧ проведено на базе диагностической лаборатории ООО «Диалаб-Плюс» (г. Москва, Россия) с использованием набора реагентов «HPV Квант-21» для выявления и типирования ВПЧ-HP (ВПЧ6, 11, 44) и ВПЧ-BP (ВПЧ16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) («ДНК-Технология», Россия).

Выявление нуклеиновых кислот (НК) респираторных и кишечных вирусов, количественное определение вируса краснухи и G/P-генотипирование РВА проводили методом ОТ-ПЦР-РВ в мультиплексном или моноспецифическом формате с праймерами и зондами преимущественно собственного дизайна. Установление таксономической принадлежности сезонных коронавирусов

человека проводили в реакции видоспецифической ОТ-ПЦР-РВ (Gaunt E.R., 2010). Секвенирование вирусных геномов проводили по Сэнгеру, либо методом НПС.

Иммуногенность вируса краснухи изучали с использованием иммунологического маркерного теста на кроликах. Вирулентность, иммуногенность и протективную активность *sa* мутантов SARS-CoV-2 оценивали путем интраназального заражения хомячков. Определение антител к вирусу краснухи и SARS-CoV-2 проводили методом ИФА и в реакции микронеутрализации. Выраженность воспалительных изменений в легких хомячков оценивали путем гистологического исследования в отделении экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ имени П.А. Герцена (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России) (Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А.). Морфодиагностические признаки вирионов выявляли методом трансмиссивной электронной микроскопии на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В.).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.03, R-Studio version 1.2.1335 и Microsoft Excel. Достоверность различий в значении параметра между малыми выборками определяли согласно U-критерию Манна-Уитни с 95% доверительным интервалом (ДИ). При исследовании распространенности ВПЧ качественные признаки представляли в форме доли штаммов ВПЧ разных типов от общего числа штаммов в группе с 95% ДИ. Частоты качественных признаков в группах сравнивались с помощью точного критерия Фишера (The Fisher exact test, two sided). Достоверными считали различия при уровне значимости $p \leq 0,05$. При множественных сравнениях учитывалась поправка Бонферрони.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Разработка методологии исследования

В данном разделе диссертации разработаны методические подходы, необходимые для дальнейшего исследования биоразнообразия ротавирусов, коронавирусов и разработки научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19.

2.1.1 Разработка тест-систем для дифференциального выявления нуклеиновых кислот респираторных и кишечных вирусов

Современный уровень клинических испытаний специфических противовирусных препаратов и вакцин требует расшифровки случаев вирусных инфекций с учетом всего спектра вероятных возбудителей заболевания. Формат мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ подходит как для этиологической диагностики ОРВИ и ОКИ, отличающихся широким разнообразием возбудителей, так и для

субвидовой таксономической характеристики вирусов (например, генотипирования вирусов). В связи с этим задачу дифференциального выявления возбудителей вирусных инфекций и генотипирования ротавирусов мы решали на основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ.

Учитывая крайне высокую степень антигенного и генетического разнообразия респираторных и кишечных вирусов, для подбора диагностических олигонуклеотидов использовали полногеномные последовательности представителей разных генотипов и серотипов вирусов. К консервативным участкам вирусных геномов были подобраны праймеры и зонды для дифференциального выявления НК 12 групп респираторных вирусов и 11 групп кишечных вирусов человека в присутствии внутреннего положительного контроля (ВПК). Диагностические олигонуклеотиды для выявления аденовирусов были направлены к L3-гену (ген гексона), бокавирусов – гену VP1, вирусов гриппа В – гену М, РСВ - гену L, риновирусов – 5'-NTR, ВПГ-1, ВПГ-2 и ВПГ-3 – гену HN, ВПГ- 4 – гену Р, вирусов гриппа А - гену М, энтеровирусов - 5'-NTR, коронавируса - гену NSP13, полиовирусов - гену VP1, ВГА - гену 2С, ВГЕ - ORF1, норовирусов - участку на стыке генов RdRp и VP1, саповирусов - ORF1, астровирусов - ORF2, орторевовирусов - сегменту L1, ротавирусов А - гену NSP4, ротавирусов С – ген VP7.

Специфичность подобранных олигонуклеотидов контролировали в реакции моноспецифической ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием в качестве контрольных образцов препаратов гомологичных и гетерологичных вирусов. Далее были определены оптимальные концентрации праймеров и зондов для каждой реакционной смеси, распределение наборов вирусоспецифических праймеров по реакционным смесям, температурно-временной режим амплификации и другие условия. Были изготовлены экспериментальные наборы реагентов (ЭНР) для выявления 12 групп респираторных и 11 групп кишечных вирусов в присутствии ВПК методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ, состоящие из праймеров и зондов, меченных различными флуоресцентными красителями, распределенных по реакционным смесям (Таблицы 1 и 2), положительных и отрицательных контрольных образцов и ферментов (обратная транскриптаза MMLV и Hot-start Taq ДНК-полимераза с антителами, ингибирующими активность фермента). Изготовленным ЭНР были присвоены рабочие названия «ОРВИ-Монитор» и «ОКИ-Монитор», составлены проекты инструкций и ТУ.

С целью получения положительных контрольных образцов с известной концентрацией вирусных НК были получены фрагменты вирусных геномов в составе плазмид (ДНК-содержащие вирусы) или РНК-транскриптов (РНК-содержащие вирусы), включающие сайты связывания с диагностическими

праймерами и зондами. Транскрипты и плазмиды разводили таким образом, чтобы концентрация вирусспецифичной НК составляла примерно 10^6 копий/мл, после чего готовили пулы положительных контрольных образцов.

Таблица 1 – Распределение вирусоспецифичных праймеров и зондов по реакционным смесям для дифференциального выявления 12 групп респираторных вирусов в ЭНР «ОРВИ-Монитор»

Флуоресцентный краситель	Реакционная смесь			
	1	2	3	4
FAM	АДВ	-	ВПГ-4	ВГрА
R6G	-	ВГрВ	ВПГ-3	ЭВ
ROX	БВ	РСВ	ВПГ-2	КВ
Cy5	ВПК	РВ	ВПГ-1	-

Таблица 2 - Распределение вирусоспецифичных праймеров и зондов по реакционным смесям для дифференциального выявления 11 групп кишечных вирусов в ЭНР «ОКИ-Монитор»

Флуоресцентный краситель	Реакционная смесь			
	1	2	3	4
FAM	АДВ	РВА	СВ	-
R6G	ЭВ	НВ	-	ПВ
ROX	ВПК	АВ	ОРВ	ВГЕ
Cy5	-	-	РВС	ВГА

В процессе проведения лабораторных испытаний ЭНР «ОРВИ-Монитор» было проанализировано 815 клинических образцов от пациентов с симптомами ОРВИ, при этом для анализа 582 образцов были использованы референсные методы, а 233 образца были от пациентов с ОРВИ неустановленной этиологии. В клинических образцах были выявлены все 12 вирусов, анализ на наличие которых предусмотрен ЭНР. Доля положительных образцов составила 51,9%, а диагностическая чувствительность - 96,7%. Диагностическая специфичность, оцененная на образцах от условно здоровых людей без симптомов ОРВИ (n=20), составила 99,2%. Воспроизводимость выявления респираторных вирусов, оцененная на панели клинических образцов (n=35), содержащих все анализируемые набором реагентов вирусы, составила 98,1%.

ЭНР «ОКИ-Монитор» в общей сложности исследовано 697 клинических образцов от пациентов с симптомами острого гастроэнтерита (ОГЭ), из которых в 499 были выявлены НК кишечных вирусов (71,6 %). По совокупности охарактеризованных на наличие разных вирусов образцов (клинических и культуральных) чувствительность ЭНР составила 98,8%. В результате анализа

образцов от условно здоровых детей (n=40) диагностическая специфичность ЭНР оценена в 99,1%.

После завершения лабораторных испытаний ЭНР «ОРВИ-Монитор» и «ОКИ-Монитор» был проведён внешний контроль качества диагностических исследований. Для этого в компании QCMD (Великобритания) были приобретены и проанализированы 7 контрольных панелей зашифрованных образцов респираторных и кишечных вирусов. Сверка данных, полученных при анализе зашифрованных образцов QCMD, показала, что чувствительность выявления образцов со статусом «основной» (core) составила 100% для всех панелей, кроме NVRNA10 (не удалось выявить один «основной» (core) образец из 7 с генотипом GI.3). В целом результаты исследования образцов панелей совпали с данными QCMD на 87%. Несовпадения с данными QCMD связаны в основном с образцами, имеющими статус «редко выявляемые» (с низким содержанием вируса).

Таким образом, были разработаны наборы реагентов «ОРВИ-Монитор» и «ОКИ-Монитор» для дифференциального выявления методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ НК широкого спектра респираторных и кишечных вирусов, адаптированные для проведения анализа на приборах ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия) и Rotor-Gene™ 6000 («Corbett Research», Австралия). Способы диагностики и нуклеотидные последовательности праймеров и зондов защищены патентами РФ RU2460803C2 и RU2506317C2. Опытные серии наборов реагентов были произведены ЗАО «Синтол», г. Москва. Набор реагентов «ОРВИ-Монитор» приказом Росздравнадзора от 19 марта 2012 года № 1211-Пр/12 разрешен к производству, продаже и применению на территории РФ (регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13218).

2.1.2 Оптимизация условий количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ

Инфекционная активность вируса краснухи в культуральной жидкости традиционно оценивается в чувствительных культурах клеток в реакции бляшкообразования или титрованием по конечной точке ЦПД. Титрование вируса краснухи в культуре клеток отличается высокой трудоемкостью, зависимостью от внешних факторов, сложностью в стандартизации и длительностью (до 12 суток). В связи с этим актуальна разработка условий быстрого количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ.

К консервативным участкам генома вируса краснухи (вид *Rubivirus rubella* семейства *Matonaviridae*) были подобраны праймеры и флуоресцентно-меченный зонд. Далее методом ОТ-ПЦР-РВ с подобранными олигонуклеотидами анализировали 10-кратные разведения вакцинного штамма Wistar RA27/3, что позволило построить калибровочный график и оценить аналитическую

чувствительность теста в 20 ТЦД₅₀/мл. Сравнительный анализ накопления вируса краснухи в культуре клеток Vero методами ОТ-ПЦР-РВ и титрования по ЦПД с 1 по 12 день после инфицирования (п.и.) позволил выявить условия, при которых результаты, получаемые обоими методами, согласуются в наибольшей степени. Со 2-го по 7-й день п.и. значения титров вируса, определенные методами ОТ-ПЦР-РВ и титрования по ЦПД, были близки, при этом разница в величинах не превышала 0,5 lg ТЦД₅₀/мл, а коэффициент корреляции Пирсона был близок к 1 ($r^2=0,98$), что свидетельствовало о хорошем совпадении результатов. На сроках культивирования до 2-го дня и после 7-го дня п.и. отмечена достоверная разница в значениях титра, определенных разными методами, которая имела тенденцию к увеличению в периоде с 7-го по 12-й день. Полученные результаты позволили установить оптимальные условия количественной оценки вируса краснухи по содержанию вирусной РНК, соблюдение которых обеспечивает высокую корреляцию данных, полученных методом ОТ-ПЦР-РВ с результатами титрования по ЦПД: использование малых доз заражения (МОИ 0,1 или ниже), сбор вирусного материала для анализа в периоде со 2-го по 7-й день п.и., получение калибровочных образцов в тех же условиях, что и исследуемый вирусный материал, удаление клеточного дебриса центрифугированием, хранение вирусного материала в условиях, минимизирующих потерю его инфекционности и др. Важно отметить, что метод ОТ-ПЦР-РВ не может полностью заменить традиционные методы контроля специфической активности вируса. Однако в случае необходимости быстрого получения результата в «режиме реального времени» метод ОТ-ПЦР-РВ представляет ценность.

2.1.3 Конструирование тест-системы для G/P-генотипирования ротавирусов группы А человека методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ

Ротавирусы группы А являются основной причиной госпитализации детей в возрасте до 5 лет с ОГЭ в странах с низким охватом вакцинацией против РВА. Вакцинопрофилактика ротавирусного энтерита позволяет значительно снизить смертность и частоту госпитализации от этого заболевания, однако на сегодняшний день в РФ вакцина против ротавирусной инфекции не включена в НКИ. РВА относятся к виду *Rotavirus alphagastroenteritidis* семейства *Sedoreoviridae*. Геном РВА представлен 11 сегментами двуцепочечной РНК, кодирующими синтез 12 белков. Стандартным рутинным подходом к классификации геновариантов РВА является G/P-генотипирование в реакции мультиплексной ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией или секвенированием соответствующих генов по Сэнгеру. Учитывая известные преимущества ОТ-ПЦР-РВ, нам представилось целесообразным сконструировать систему для генотипирования РВА на основе этого метода. За систему классификации

генотипов РВА были приняты рекомендации ВОЗ и международной Рабочей группы по таксономии ротавирусов (Matthijnssens J., 2008). При подборе праймеров и зондов для ОТ-ПЦР-РВ их направляли на типоспецифические участки генов G, P и I. Для дифференциального выявления в реакции ОТ-ПЦР-РВ 10 вариантов генов РВА, кодирующих белки VP7 (G1, G2, G3, G4, G9), VP4 (P[4], P[6], P[8]) и VP6 (I1, I2), сформировано пять реакционных смесей, в каждой из которых выявляется по два варианта генов (Таблица 3).

Таблица 3 - Реакционные смеси для дифференциального выявления 10 вариантов генов РВА методом мультиплексной ПЦР-РВ

Реакционные смеси Флуорофор	Номер реакционной смеси и выявляемые варианты генов				
	1	2	3	4	5
ROX	G1	G2	G3	G4	G9
R6G	P[4]	P[6]	P[8]	I1	I2

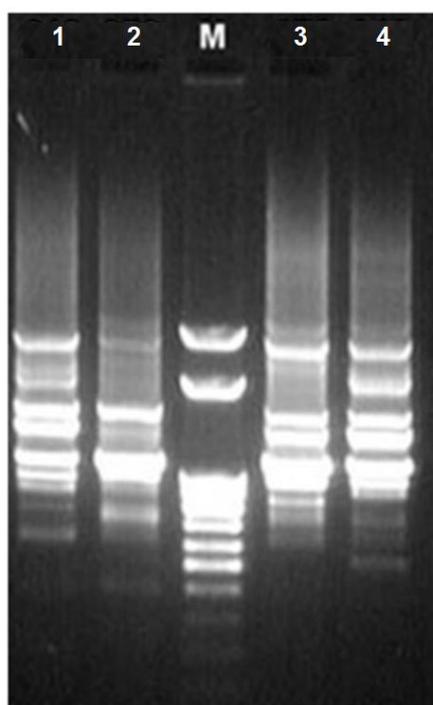
Валидация разработанной тест-системы проведена с использованием фекальных образцов от детей с подтвержденным ротавирусным энтеритом и двух референсных методов генотипирования РВА, рекомендованных ВОЗ - мультиплексная ПЦР с детекцией в агарозном геле и секвенирование фрагментов генов G и P. Результаты генотипирования клинических изолятов РВА тремя методами были сопоставимы. Всего в процессе валидации метода были определены и депонированы в базу данных GenBank NCBI 44 нуклеотидные последовательности генов G и P 35 изолятов РВА (GenBank ID с KT000090.1 по KT000133.1).

2.1.4 Разработка нового подхода к генетической характеристике ротавирусов методом нанопорового секвенирования

Разработка технологии нанопорового секвенирования (НПС) открыла новые перспективы совершенствования методов эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции. Преимуществами НПС является портативность секвенатора, высокая производительность, быстрая пробоподготовка, уникальная возможность получения длинных прочтений, возможность мультиплексного анализа, отсутствие необходимости капитальных вложений в оборудование. Для быстрой подготовки генетического материала для НПС подходит высокоочищенная двуцепочечная ДНК. Следовательно, подготовка для НПС генома РНК-содержащих вирусов, в особенности РВА, имеющих сегментированный РНК-геном, требует разработки специфических подходов.

ДНК-копии ротавирусного генома получали в двух последовательных реакциях ОТ и ПЦР. Для получения полноразмерной кДНК генных сегментов

РВА были сконструированы шесть универсальных праймеров (unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2, unRAR3) для ОТ, комплементарные консервативным областям на 5'- и 3'-концах генных сегментов РВА. Все праймеры для ОТ были удлинены на 5'-конце 20-нуклеотидной последовательностью для связывания с универсальным праймером Up, предназначенным для ПЦР-амплификации сегментов ротавирусного генома. Разработанные праймеры были апробированы на ротавирусной РНК, выделенной из вирусного материала, полученного в культуре клеток и из фекальных образцов от детей с лабораторно подтвержденным ротавирусным энтеритом. Продукты ОТ-ПЦР с универсальными праймерами, проведенной на основе вирусной РНК из клинических образцов, были представлены несколькими фракциями ДНК с преобладанием фрагментов от 600 до 3000 п.н., что соответствует распределению длин сегментов генома РВА (Рисунок 1).



Электрофорез ампликонов в агарозном геле с бромистым этидием. Дорожки: 1, 2, 3, 4 – продукты амплификации образцов ротавирусной кДНК. М – маркер молекулярного веса ДНК (справа от рисунка указаны размеры фрагментов ДНК маркера, п.н.).

п.н.
3000
2000
1000
500

Рисунок 1 - Продукты специфической амплификации вирусной кДНК, полученные в реакции ОТ-ПЦР

Эффективность амплификации сегментов генома РВА, оцениваемая по приросту концентрации ротавирусспецифичной ДНК в результате ПЦР-амплификации, варьировала для разных генных сегментов от $4,2 \cdot 10^4$ до $2,7 \cdot 10^6$.

Современная система субвидовой классификации РВА предполагает генотипирование по всем 11 генным сегментам - G-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H. Большинство циркулирующих геновариантов РВА человека относятся к трем эволюционным линиям, отличающимся конstellациями генома: Wa-подобные (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1-подобные (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) и AU-1-подобные (G3-P[3]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3)

(Matthijnsens J., 2008). В связи с этим, для оценки эффективности метода НПС были выбраны лабораторные штаммы РВА Wa, DS-1 и 568, относящиеся к упомянутым эволюционным линиям. НПС геномов штаммов Wa, DS-1 и 568 позволило получить 97443, 100889 и 111429 прочтений, соответственно. Доля прочтений, классифицированных как фрагменты генома РВА от общего количества прочтений, превышала 85%, что указывает на высокую специфичность ОТ-ПЦР-амплификации. Для каждого из 11 генных сегментов штамма Wa получены прочтения (от 81 до 54651 прочтений) (Таблица 4), при этом достигнуто 99,6%-е покрытие всего генома.

Таблица 4 - Результаты НПС генома штамма Wa РВА (культуральный вирус)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R1	1592	97,9	99,9
2.	VP2	C1	54651	100	99,9
3.	VP3	M1	8003	100	100
4.	VP4	P[8]	5898	100	99,9
5.	NSP1	A1	926	100	99,9
6.	VP6	I1	2697	100	99,7
7.	NSP3	T1	11099	100	99,9
8.	NSP2	N1	3188	100	100
9.	VP7	G1	8276	100	99,8
10.	NSP4	E1	81	100	99,6
11.	NSP5/6	H1	1032	100	99,7

* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма Wa, GenBank ID с JX406747.1 по JX406757.1.

В общей сложности методом НПС были получены и депонированы в GenBank последовательности генных сегментов штаммов РВА Wa (GenBank ID с MT796878 по MT796888), DS-1 (GenBank ID с MT796870 по MT796877), 568 (GenBank ID с MT796860 по MT796869), а также трех РВА из клинических образцов: RVA/Hu/RUS/Moscow-714/2014 (GenBank ID с MT767398 по MT767408), RVA/Hu/RUS/Moscow-40/2020/G3 (GenBank ID с MW558493.1 по MW558502.1), RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 (GenBank ID с MT876633 по MT876642).

Точность НПС геномов штаммов Wa и DS-1 превышала 99,5%, что позволяет не только определить генотип, но и установить штаммовую принадлежность вируса. Несмотря на то, что покрытие генома варьировало для разных штаммов от 59,0 до 99,6% (в среднем 86%), для всех исследованных геновариантов РВА дана

генетическая характеристика генных сегментов – 9-го, 4-го и 6-го, определяющих G/P-генотип (белки VP7 и VP4) и серогруппу (белок VP6).

В настоящем исследовании методом НПС охарактеризованы РВА животного происхождения - штамм 568 (филогенетически близок штамму РВА макак-резусов RRV, предположительно реассортант РВА различных видов животных, включает варианты генов AU-1-подобных РВА - G3, P[3], C3, M3, T3, E3), а также РВА из клинических образцов RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 (G4P[6]I1) и RVA/Hu/RUS/Moscow-40/2020/G3 (G3P[8]I2), филогенетически близкие РВА свиней и лошадей, соответственно. Для большинства генов РВА 568 и RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 и RVA/Hu/RUS/Moscow-40/2020/G3 получены полноразмерные нуклеотидные последовательности, что свидетельствует о применимости разработанного подхода для генетического анализа РВА животного происхождения.

2.2 Исследование видового и субвидового разнообразия возбудителей вирусных заболеваний

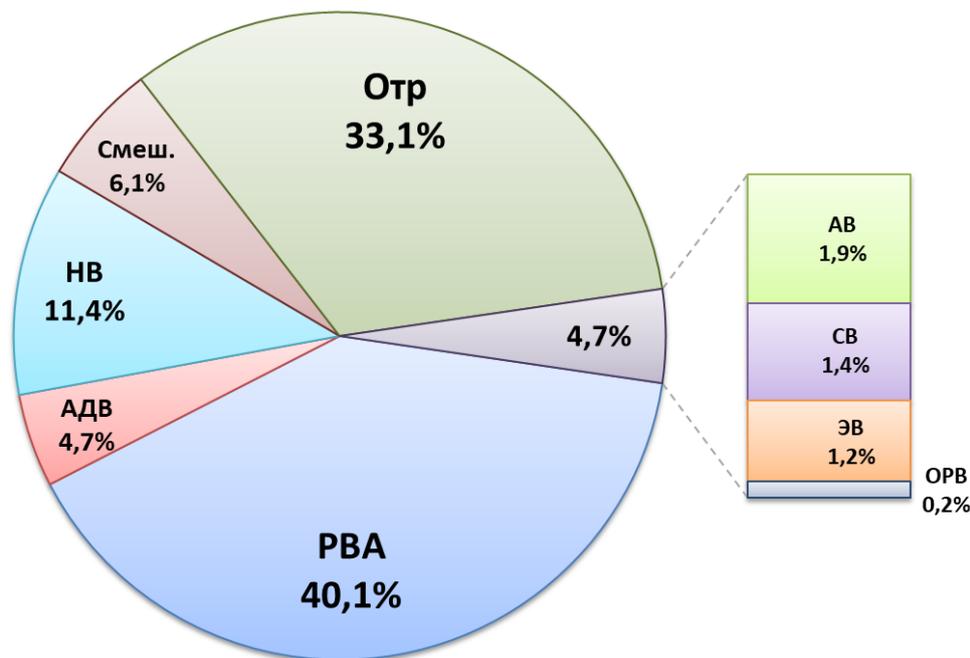
2.2.1 Исследование генетического разнообразия ротавирусов человека на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг.

Высокая изменчивость РВА, территориальные различия в распределении циркулирующих геновариантов, увеличение их разнообразия под влиянием естественного и поствакцинального иммунитета, изменение генетической структуры РВА как в странах с плановой вакцинацией, так и без нее, требуют постоянного эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции.

Для оценки роли РВА в этиологии ОГЭ методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ на наличие НК кишечных вирусов была исследована панель фекальных образцов (n=594), собранных в период с января 2009 по январь 2014 гг. (Рисунок 2). Исследованные образцы были получены от 429 детей в возрасте до 5 лет (медиана 13,5 месяцев), госпитализированных с диагнозом ОГЭ в стационары г. Москвы в первые 72 часа от начала заболевания, при этом у 165 детей образцы стула были собраны дважды - в день госпитализации и перед выпиской из стационара с интервалом в 7 дней (медиана).

Полученные результаты показали ведущую роль РВА (40,1% от всех случаев) в этиологии случаев госпитализации с ОГЭ, при этом в составе случаев смешанной инфекции (6,1%) также преобладали РВА. Второе и третье место в этиологической структуре ОГЭ принадлежит норовирусам и аденовирусам (11,4% и 4,7%, соответственно). Долевое участие астровирусов, саповирусов, энтеровирусов и орторевирусов в этиологии ОГЭ было незначительным – от 0,2 до 1,9%. Доля случаев с отрицательным результатом теста составила 33,1%.

Кроме того, выявлен высокий уровень лабораторно подтвержденных случаев внутрибольничного инфицирования кишечными вирусами – 24,9% от общего числа госпитализированных детей с доминированием случаев ротавирусной (52,4%) и норовирусной (28,6%) нозокомиальной инфекции.



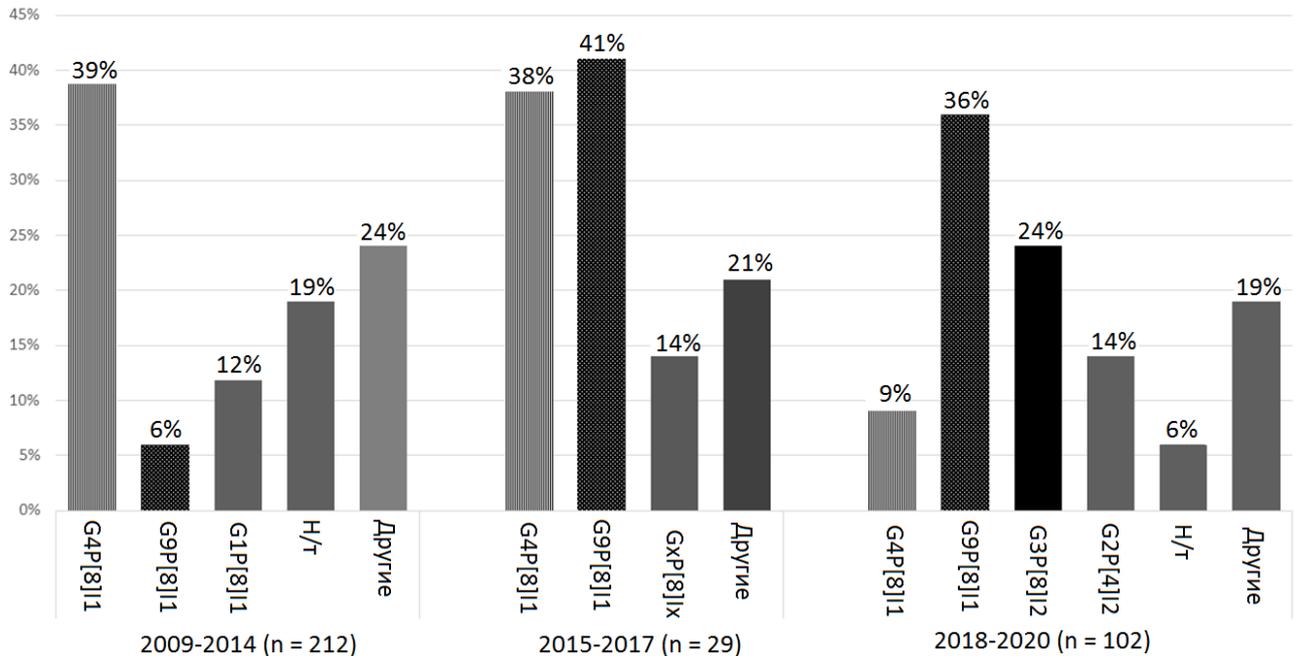
Результаты мультиплексного ОТ-ПЦР-РВ анализа фекальных образцов. Отр – отрицательный результат; Смеш. – случаи смешанной инфекции.

Рисунок 2 - Структура кишечных вирусов, выявленных у детей с ОГЭ методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ при их поступлении в стационары г. Москвы в период с 2009-2014 гг. (n=429)

Генотипирование 170 РВА, выявленных в клинических образцах в период с 2009 по 2014 гг., показало доминирование генотипа G4P[8] (48,2%), тогда как частота выявления генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] была значительно ниже (от 14,7% до 4,1%) (Рисунок 3).

Генотипирование 131 РВА, выявленных в клинических образцах от детей с ОГЭ в период с 2015 по 2020 гг. (n=289), позволило установить G/P-генотип в 118 случаях (90,1%), в 7 случаях (5,3%) определить только вариант гена Р (P[8]), тогда как в 6 случаях (4,6%) генотип установить не удалось. В период с 2015 по 2020 гг. РВА с генотипом G9P[8]I1 доминировали в общей структуре – 37%, второе место занимали G3P[8]I2 (новый DS-1-подобный геновариант) – 18%, далее - G4P[8]I1 – 15%, G2P[4]I2 – 11%, G1P[8]I1 – 5%, G3P[8]I1 – 2%. Также были обнаружены единичный случай смешанной инфекции (G9P[8]I1 и G2P[4]I2) и РВА с редким генотипом G4P[6]I1.

Особый интерес представляет РВА с генотипом G3P[8]I2, имеющий эпидемический потенциал, который был впервые нами выявлен в 2018 году. В период с 2018 по 2020 гг. его доля в общей структуре РВА достигла 24% - по этому показателю он уступал только генотипу G9P[8]I1 – 36% (Рисунок 3).



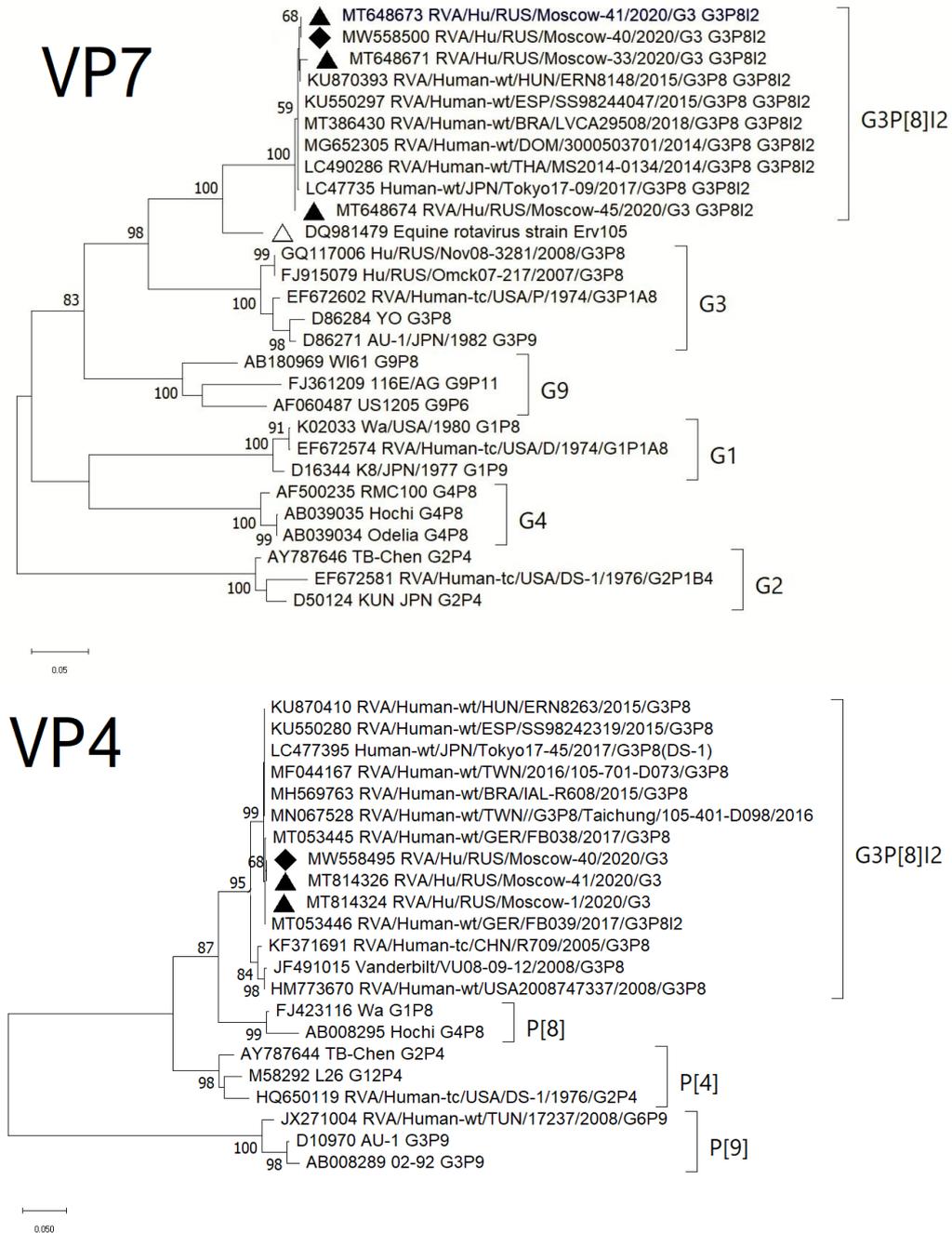
Н/т – нетипируемые РВА.

Рисунок 3 - Распределение G/P-генотипов, выявленных в московском регионе за 10 лет наблюдения (2009-2020 гг.)

Результаты секвенирования (GenBank ID с MW558493 по MW558502) и филогенетического анализа показали, что выявленный нами РВА G3P[8]I2 близок к реассортантному геноварианту РВА, впервые выявленному в Таиланде в 2013 г. и широко распространившемуся в последние годы на территории Европы, Азии и Австралии (Рисунок 4). Данный штамм имеет DS-1-подобную констелляцию генов (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), за исключением гена G (VP7), который, в обычных для данной констелляции случаях, представлен геновариантом G2, в то время как для геноварианта G3 более характерна Wa-подобная констелляция. По предположению ряда исследователей, геновариант G3P[8]I2 образовался в результате реассортации DS-1-подобного РВА человека и РВА лошадей, близкого штамму Erv105 (GenBank ID DQ981479.1), поскольку с геном G этого штамма выявлено наибольшее сходство (Рисунок 4).

По данным Референс-центра по мониторингу ОКИ на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, распространение РВА с генотипом G3P[8] на территории РФ продолжилось в 2021-2023 гг. (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2023 году»). Уже в 2022 году сформировалось доминирование РВА с генотипом G3P[8],

при этом в 2023 г. доля G3P[8] продолжила увеличиваться, что согласуется с результатами мониторинга ротавирусной инфекции на территории Нижегородской [Sashina T.A., 2023] и Свердловской областей [Старикова П.К., 2024].



Сегменты, секвенированные по Сэнгеру, отмечены значком ▲; сегменты, секвенированные методом НПС, отмечены значком ◆, ген белка VP7 РВА лошади (штамм Erv105) отмечен значком △. Для обозначения РВА использовали GenBank ID, названия штаммов и G/P-генотип.

Рисунок 4 – Филогенетический анализ генов белков VP4 (P) и VP7 (G) нового геноварианта РВА с генотипом G3P[8]I2

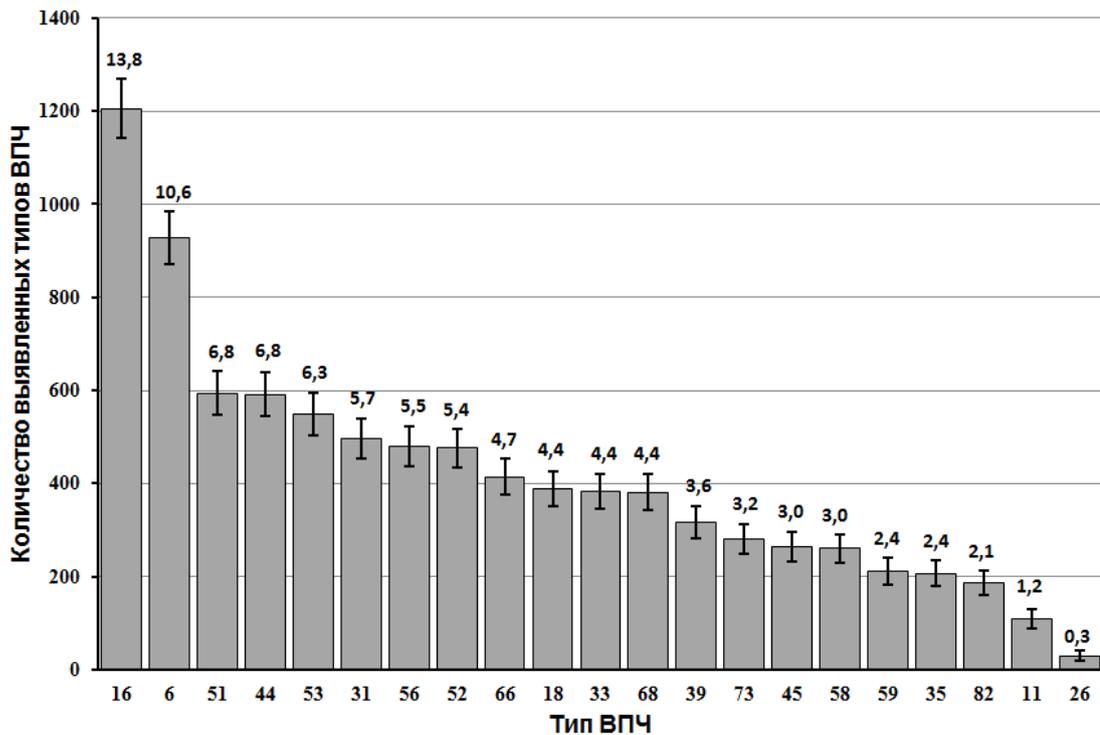
Таким образом, в период с 2015 по 2020 гг. в генетической структуре РВА, циркулирующих на территории московского региона, произошли существенные изменения: снизилась встречаемость генотипа G4P[8]I1, который занимал лидирующую роль в предыдущие годы. В то же время выросло количество случаев госпитализации, вызванной РВА с генотипами G9P[8]I1 и G3P[8]I2. В исследуемый период нами выявлены РВА предположительно животного происхождения, как в единичных случаях (G4P[6]I1), так и в значительном количестве (реассортантный G3P[8]I2), что является свидетельством важной роли межвидовой трансмиссии в эволюции РВА, патогенных для человека.

2.2.2 Исследование генетического разнообразия клинически значимых папилломавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации

ВПЧ-инфекция является важной проблемой здравоохранения. ВПЧ инфицирует клетки базального слоя эпителия, что приводит к их неконтролируемому размножению, последствием чего может быть появление папиллом, остроконечных кондилом, а также возникновение злокачественных опухолей различной локализации. Среди ВПЧ наибольшую клиническую значимость имеют представители рода *Alphapapillomavirus* семейства *Papillomaviridae*, в том числе 13 типов ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВР), принадлежащих к видам *Alphapapillomavirus 5* (ВПЧ51), *Alphapapillomavirus 6* (ВПЧ56), *Alphapapillomavirus 7* (ВПЧ18, 39, 45, 59, 68) и *Alphapapillomavirus 9* (ВПЧ16, 31, 33, 35, 52, 58), и по крайней мере семь других типов (ВПЧ26, 53, 66, 67, 70, 73, 82) являются потенциально канцерогенными. Кроме того, важна идентификация ВПЧ низкого канцерогенного риска (ВПЧ-НР), возбудителей доброкачественных кондилом, относящихся к виду *Alphapapillomavirus 10* - ВПЧ6, 11, 13, 44 (de Villiers E.-M., 2004).

В течение 2019 года на базе диагностической лаборатории ООО «Диалаб-Плюс» (г. Москва, Россия) было проведено лабораторное обследование 12945 пациентов из различных регионов РФ с подозрением на ВПЧ-инфекцию, по результатам которого ДНК ВПЧ выявлена в 5013 случаях (38,7%). В том числе у 3057 пациентов выявлена моноинфекция ВПЧ, тогда как у 1956 пациентов - смешанная инфекция, поэтому при общем количестве вирусоносителей 5013, количество положительных находок (ВПЧ разных типов) составило 8583. Генотипирование ВПЧ показало, что самые высокие ранговые значения по удельному весу занимают ВПЧ16 - 13,8% (13,0-14,5), ВПЧ6 - 10,6% (10,0-11,3), ВПЧ51 и ВПЧ44 - 6,8% (6,3-7,3), ВПЧ53 - 6,3% (5,8-6,8), доля которых в общей структуре составляет - 44,3%. Наименьшее количество случаев выявлено для типов ВПЧ59 и ВПЧ35 - по 2,4% соответственно, ВПЧ82 - 2,1 %, ВПЧ11 - 1,2%, ВПЧ26 - 0,3% (Рисунок 5).

В России еще не началась массовая вакцинопрофилактика ВПЧ-инфекции. В связи с этим, полученные результаты о распространенности ВПЧ разных типов на территории страны очень важны для прогнозирования эффективности вакцинопрофилактики папилломавирусных заболеваний, вызванных разными типами вируса. Полученные результаты представляют также интерес для разработчиков ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют формулировать их состав с учетом региональных особенностей распространенности разных типов ВПЧ.



Над столбцами указана доля (%). Вертикальные отрезки в вершинах столбцов показывают границы 95% ДИ.

Рисунок 5 - Распределение выявленных ВПЧ по типам (n=8583)

2.2.3 Исследование видового разнообразия сезонных коронавирусов человека на территории московского региона в период с 2009 по 2014 гг.

Задача исследования видового разнообразия КВ стояла перед нами в период с 2009 по 2014 года – задолго до начала пандемии COVID-19. На тот момент было известно шесть патогенных для человека представителей семейства *Coronaviridae*, включая сезонные КВ человека HCoV-229E (вид *Alphacoronavirus chicaoense*), HCoV-OC43 (вид *Betacoronavirus gravedinis*), HCoV-NL63 (вид *Alphacoronavirus amsterdamense*), HCoV-NKU1 (вид *Betacoronavirus hongkongense*) и КВ животного происхождения SARS-CoV-1 (вид *Betacoronavirus pandemicum*) и MERS-CoV (вид *Betacoronavirus cameli*). Для выявления РНК четырех КВ человека в клинических образцах использовали универсальный набор праймеров и зондов собственного дизайна. Для дифференциального выявления РНК КВ человека HCoV-229E,

НCoV-OC43, НCoV-NL63 и НCoV-НКУ1 были использованы видоспецифичные праймеры и зонды (Gaunt E.R., 2010).

Для изучения видового разнообразия КВ из лабораторного музея клинических образцов были отобраны 29 образцов, в которых методом ОТ-ПЦР-РВ обнаружена РНК КВ, включая случаи смешанной инфекции. Методом ОТ-ПЦР-РВ с видоспецифичными праймерами в 3 образцах был идентифицирован НСОВ-229Е, в 9 – НСОВ-NL63, в 7 – НСОВ-НКУ1, в 10 – НСОВ-OC43. При этом не было получено спорных результатов, а все образцы были однозначно соотнесены с видом. Среди 29 случаев коронавирусной инфекции было выявлено 25 случаев моноинфекции, из которых в 13 случаях лечение проводилось в стационаре и в 12 случаях – в амбулаторных условиях (Таблица 5).

Таблица 5 - Распределение случаев коронавирусной моноинфекции среди разных категорий пациентов

Коронавирус Лечение	НСОВ- 229Е	НСОВ- NL63	НСОВ- НКУ1	НСОВ- OC43	Всего
Лечение в стационаре	0	7*	0	6*	13
Амбулаторное лечение	3**	0	6**	3**	12
Всего	3	7	6	9	25

* - дети в возрасте от 1 до 5 лет

** - взрослые (пациенты старше 16 лет)

Таким образом, установлено, что на территории московского региона в период с 2009 по 2014 гг. циркулировали представители всех четырех известных на тот момент видов сезонных КВ человека – НСОВ-NL63, НСОВ-229Е, НСОВ-OC43 и НСОВ-НКУ1. Все выявленные случаи коронавирусной моноинфекции, сопровождавшиеся госпитализацией пациента, были связаны с инфицированием детей в возрасте от 1 до 5 лет НСОВ-NL63 и НСОВ-OC43. Полученные результаты подтверждают тезис об убиквитарности сезонных КВ человека.

2.3 Разработка научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19

2.3.1 Выявление фенотипических и генетических маркеров аттенуации вируса краснухи

Краснуха – острое вирусное заболевание, вызванное вирусом краснухи (вид *Rubivirus rubella*). Вакцинация является наиболее эффективным, экономически оправданным и доступным средством борьбы с краснухой. Ранее в НИИ вирусных препаратов им. О.Г. Анджaparидзе (ныне: отдел вирусологии ФГБНУ

НИИВС им. И.И. Мечникова) под руководством д.м.н. Десятковой Р.Г. был получен *ca/att* штамм вируса краснухи С-77 (Зверев В.В., 2008). В процессе адаптации к культуре клеток Vero (34 пассажа при температуре 35°C и 14 пассажей при 33°C) штамм приобрел свойство вызывать выраженную дегенерацию клеток RK-13, проявляя по этому признаку сходство с вакцинным штаммом Wistar RA27/3. Это является проявлением адаптации вируса к новому хозяину и может быть свидетельством его аттенуации. Другое экспериментальное свидетельство аттенуации *ca* мутанта штамма С-77 – более низкая по сравнению с родительским штаммом иммуногенность для мышей.

Мы исследовали *ca* варианты штамма С-77, полученные на пассажных уровнях 39 и 46 (*ca39* и *ca46*). Установлено, что на пятый день культивирования при 39°C титр *ca46*, *ca39* вариантов штамма С-77 и штамма Wistar RA27/3 был меньше на 2,6, 2,2 и 1,1 lg ТЦД₅₀/мл соответственно, чем при температуре культивирования 33°C ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни), тогда как дикий (*wt*) штамм С-77 размножался при этих температурах с одинаковой эффективностью. Это подтверждает наличие у *ca* вариантов штамма С-77 *ca* фенотипа. Наличие у вариантов *ca46* и *ca39* штамма С-77 иммунологического маркера аттенуации, описанное Десятковой Р.Г., было подтверждено нами в эксперименте по внутривенной иммунизации кроликов диким и *ca* вариантами штамма С-77.

С целью выявления вероятных генетических детерминант аттенуации было проведено полное секвенирование генома *wt* и *ca39* вариантов штамма С-77. В результате были определены последовательности, кодирующие вирусные белки (GenBank ID KT000088 и KT000089), что позволило отнести штамм С-77 к генотипу 1h. В результате проведенного сравнительного анализа у варианта *ca39* обнаружено 13 нуклеотидных замен, из которых 6 несинонимичных (Таблица 6).

Во фрагменте, кодирующем ORF неструктурных белков (ORF NSP), было обнаружено 8 нуклеотидных замен, 4 из которых ведут к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем ORF структурных белков (ORF SP), было обнаружено 5 нуклеотидных замен, 2 из которых несинонимичные (Таблица 6). Четыре аминокислотные замены являются уникальными, то есть не встречаются у диких штаммов вируса краснухи, представленных в базе данных GenBank, - в ORF NSP локализуются замены Tyr1042Cys и Ser1106Thr в протеазе, в ORF SP - замены Leu27Phe в белке С и Ala567Thr в белке E2.

Замена Tyr1042Cys в протеазном домене ORF NSP также не встречалась у других вакцинных штаммов, однако в этой же позиции у штаммов Matsuba и Takahashi vaccine имеется замена Tyr1042His. Более того, у двух вакцинных штаммов TCRB-19 и Cendehill, для которых не сохранились родительские штаммы, в позиции 1042 находятся аминокислоты Cys и His соответственно. Следовательно, замена Tyr1042Cys в области, кодирующей протеазу ORF NSP,

вероятно играет ключевую роль в приобретении *ts* фенотипа *ca* мутантом штамма С-77. Мутант *ca39* штамма С-77 по своим биологическим свойствам может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной ЖАВ против краснухи.

Таблица 6 - Мутации, выявленные у варианта *ca39* штамма С-77

Участок генома		Нуклеотидные замены			Аминокислотные замены			
		Позиция	<i>wt</i>	<i>ca39</i>	Уникальность**	Позиция	<i>wt</i>	<i>ca39</i>
ORF NSP	P150	164	ACC	TCC	Нет	21	Thr	Ser
		328	AGC	AGT*	Да	-	-	-
		2320	AGC	AGT*	Нет	-	-	-
		3165	TAC	TGC	Да ***	1042	Tyr	Cys
		3357	AGT	ACT	Да	1106	Ser	Thr
	P90	5360	CTC	TTC	Нет	1774	Leu	Phe
		6064	TTC	TTT*	Да***	-	-	-
6223		GTC	GTT*	Нет	-	-	-	
ORF SP	С	6588	CTC	TTC	Да	27	Leu	Phe
		7392	GCC	GCT*	Нет	-	-	-
	E2	7490	CAT	CAC*	Нет	-	-	-
		8199	GCC	ACC	Да	564	Ala	Thr
	E1	8957	GTC	GTT*	Нет	-	-	-

* Синонимичная замена. ** Замена не встречается у диких штаммов вируса краснухи, представленных в базе данных GenBank. *** Обнаружено совпадение только с одной последовательностью дикого штамма из базы данных GenBank. Жирным шрифтом выделены уникальные аминокислотные замены.

2.3.2 Получение и характеристика холодоадаптированных мутантов коронавируса SARS-CoV-2

Живые аттенуированные вакцины способны обеспечить формирование иммунного ответа как к структурным, так и неструктурным вирусным белкам и активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета. Одним из традиционных и эффективных подходов к созданию ЖАВ является получение *ca* мутантов вируса. Основанные на *ca/ts/att* штаммах живые гриппозные вакцины, принципы создания которых сформулированы более 50 лет назад (Alexandrova G.I., 1965; Maassab H.F., 1967), сочетают перекрестную протективную активность, простоту интраназального введения, формирование мукозального иммунитета во входных воротах инфекции. Применение ЖАВ обосновано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку они отличаются низкой себестоимостью производства. Несмотря на завершение пандемии COVID-19, разработка ЖАВ против этого заболевания представляется актуальной проблемой. В случае появления новых эпидемически

значимых вариантов SARS-CoV-2 или передачи SARS-CoV-подобных КВ от животных человеку возможны новые подъемы заболеваемости, в то время как потенциал ЖАВ в профилактике COVID-19 остается нереализованным.

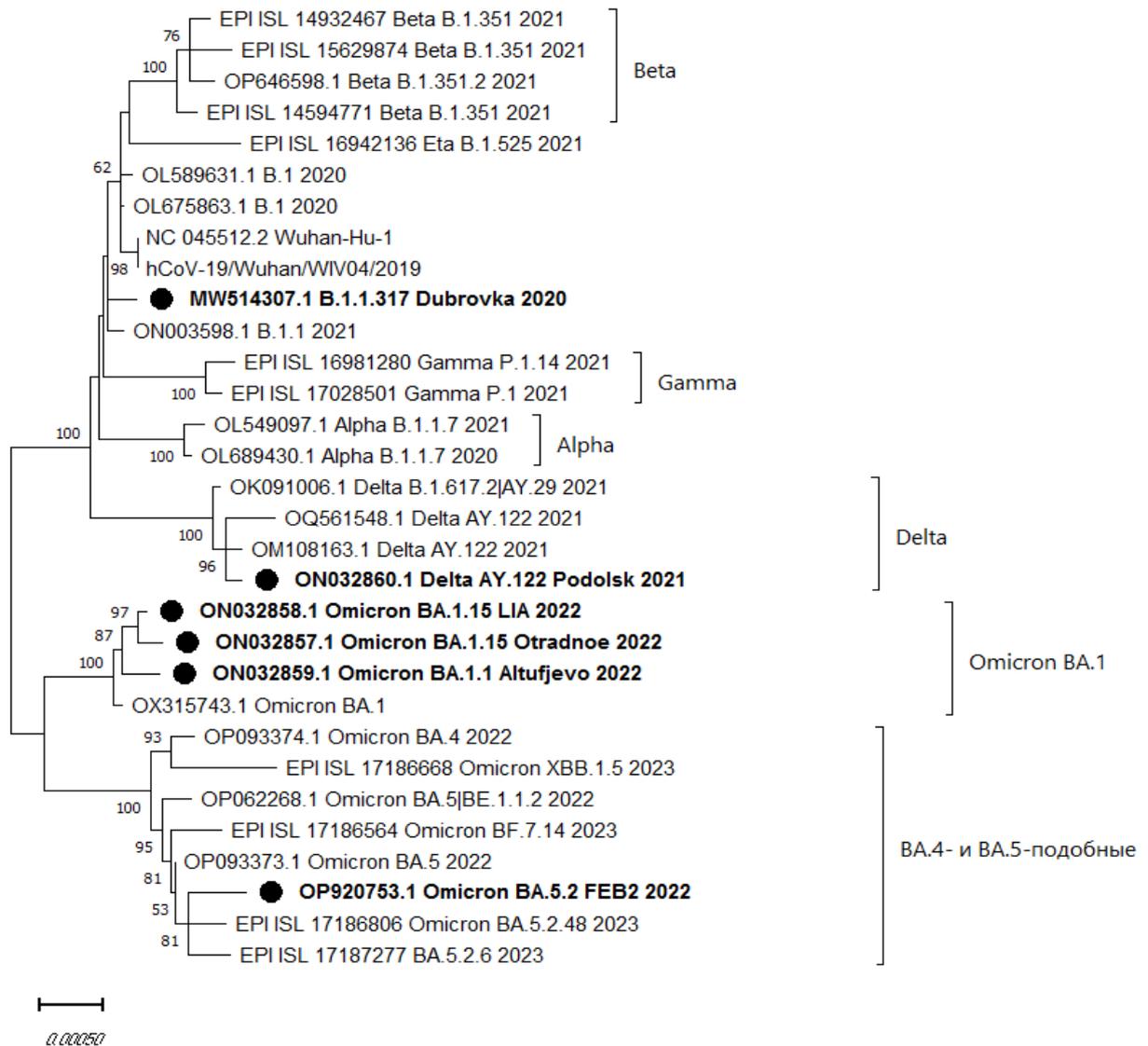
Путем выделения в культуре клеток Vero CCL-81 от пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 в разные периоды пандемии нами получены изоляты SARS-CoV-2, относящиеся к разным эпидемически значимым вариантам (Таблица 7).

Таблица 7 – Субвидовая таксономическая характеристика изолятов SARS-CoV-2

№п/п	Изолят	Дата	Линия по Pango, вариант	Номер GenBank
1	Dubrovka	15.06.2020	B.1.1.317, Ухань-подобный	MW514307.1
2	Podolsk	27.07.2021	AY.122, Delta	ON032860.1
3	LIA	27.01.2022	BA.1.15, Omicron	ON032858.1
4	Altufjevo	25.01.2022	BA.1.1, Omicron	ON032859.1
5	Otradnoe	20.01.2022	BA.1.1, Omicron	ON032857.1
6	FEB2	06.10.2022	BA.5.2, Omicron	OP920753.1

В полученных вирусных препаратах методом трансмиссивной электронной микроскопии были выявлены вирусные частицы с морфодиагностическими признаками КВ. Таксономическая принадлежность изолятов к виду *Betacoronavirus pandemicum* семейства *Coronaviridae* была установлена методом ОТ-ПЦР-РВ и подтверждена путем полногеномного секвенирования с последующим филогенетическим анализом (Рисунок 6). Субвидовая таксономическая характеристика была дана с помощью онлайн-программы Pango. Анализ геномов лабораторных изолятов вируса, полученных в разные периоды пандемии COVID-19, показал, что они относятся к различным эпидемически значимым вариантам - Wuhan-подобный, Delta, Omicron (Таблица 7).

Штамм Dubrovka (D), филогенетически близкий штамму Wuhan-Hu-1 (GenBank ID NC_045512.2), получен нами летом 2020 года в г. Москве путем изоляции в культуре клеток Vero CCL-81 из клинического образца пациента с подтвержденным диагнозом COVID-19 и охарактеризован путем полногеномного секвенирования (Таблица 7). Холодоадаптированный вариант штамма D (Dubrovka-ca, D-ca) получен в результате выращивания штамма D в культуре клеток Vero CCL-81 в течение 42 пассажей при постепенно понижаемой с 37⁰С до 23⁰С температуре. Клоны-мутанты D-B4 и D-D2 получены путем трехкратного клонирования варианта D-ca методом предельных разведений в 96-луночных планшетах при температуре 23⁰С.



Древо строили методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов древа оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных древ, поддерживающих данную группу. Знаком ● отмечены лабораторные изоляты SARS-CoV-2.

Рисунок 6 - Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей геномов лабораторных изолятов SARS-CoV-2 и референсных штаммов

Для вариантов штамма D (D-ca, D-B4 и D-D2) определены полные последовательности геномов (GenBank ID ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1, соответственно) и проведен их сравнительный анализ (Таблица 8).

Таблица 8 - Аминокислотные замены в белках *sa* мутантов SARS-CoV-2 (сравнение с родительским штаммом D)

<i>sa</i> мутант штамма D	Неструктурные белки							Структурные белки		
	nsp3	nsp4	nsp5	nsp6	nsp10	nsp12	nsp16	S	E	M
D-B4	I2181T	I2921H*	L3338F	-	T4302I	N4358K	T6938I	G35V* E475D P803R Q884K* Q893H F1147F	V14I	T7I
D-D2	A1092G I2181T T2274I	Q2724K	C3423F	I3693T	-	N4358K	D6897A*	T33I* G35S* E475D P803R Q893H F1147F C1241W*	T30I	T7I

ORF – открытая рамка считывания; nsp – неструктурный белок; структурные белки: S – spike (шиповидный), E – envelope (оболочечный), M – membrane (мембранный), N – nucleocapsid (нуклеокапсид). Знаком «*» отмечены уникальные замены по отношению к геномам SARS-CoV-2, депонированным в GenBank.

Первичный анализ геномов *sa* мутантов штамма D выявил значительное количество нуклеотидных замен, большинство из которых были несинонимичными. В геноме неклонированного варианта D-*sa* в результате холодной адаптации в культуре клеток Vero CCL-81 появилось 17 нуклеотидных замен, из которых 16 приводили к аминокислотным заменам. В геномах клонов-мутантов D-B4 и D-D2 обнаружено 16 и 20 нуклеотидных замен, которые привели к 14 и 17 аминокислотным заменам, соответственно. В S-гене *sa* мутантов было локализовано наибольшее число несинонимичных замен – 6 и 7 для D-B4 и D-D2, соответственно (Таблица 8).

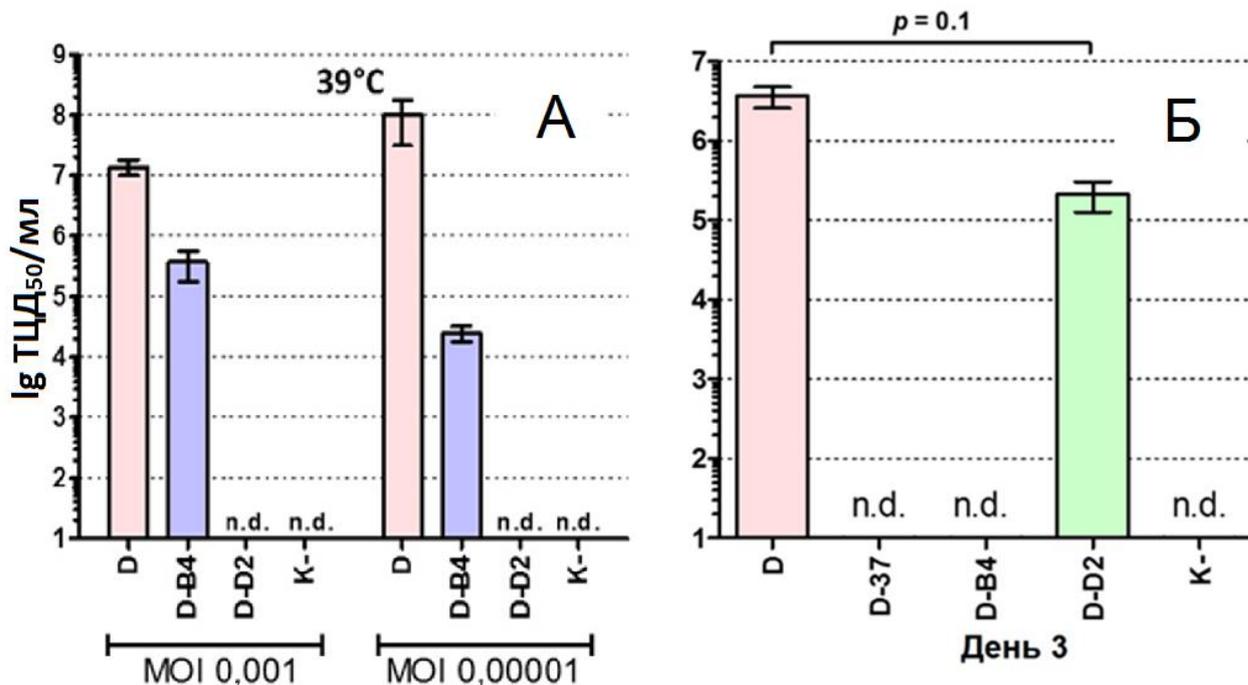
Гипотетически адаптация вируса к клеткам другого хозяина в условиях пониженной температуры должна была привести к снижению вирулентности *sa* мутантов по сравнению с родоначальным штаммом D. Поскольку маркерами аттенуации холодоадаптированных вирусов являются *sa* и *ts* фенотип, мы оценили наличие этих маркеров у мутантов D-B4 и D-D2.

Штаммы D-B4 и D-D2 проявляли *sa* фенотип, поскольку эффективно размножались в культуре клеток Vero CCL-81 при температуре 23°C, достигая на 5 день п.и. титра 6,7 – 7,3 lg ТЦД₅₀/мл, тогда как родительский штамм D в этих условиях не размножался. При температуре 37°C репродуктивная активность мутантов D-B4 и D-D2 в клетках Vero CCL-81 была сопоставима с родительским штаммом D. При температуре 39°C штамм D и *sa* мутант D-B4 размножались, о чем свидетельствует достоверный прирост титра вируса на 2-3 день п.и., тогда как штамм D-D2 при температуре 39°C не размножался, проявляя выраженный *ts* фенотип. Штамм D-B4 проявлял менее выраженные признаки *ts* фенотипа, сохранив ограниченную способность к размножению при температуре 39°C (Рисунок 7А).

Поскольку оба *sa* мутанта D-B4 и D-D2 независимо от наличия *ts* фенотипа обладали сниженной вирулентностью для хомячков, мы предположили, что не только *sa* фенотип и температурная чувствительность являются вероятными маркерами аттенуации вируса. С целью оценки видовой и тканевой специфичности мутантов D-B4 и D-D2 было проведено сравнение их репродуктивной активности в клетках карциномы легких человека Calu-3 и в клетках почки обезьяны Vero CCL-81. В результате показано, что мутант D-B4 утратил способность к размножению в клетках Calu-3, тогда как штамм D и мутант D-D2 размножались, достигая титра 5,1 lg ТЦД₅₀/мл и более (Рисунок 7Б).

Для моделирования коронавирусной пневмонии и оценки вирулентности, иммуногенности и протективной активности *sa* мутантов SARS-CoV-2 использовали золотистых сирийских хомячков. У хомячков, зараженных интраназально *sa* мутантами D-B4 и D-D2 в дозе 4,0 lg ТЦД₅₀/голову, не наблюдалось задержки в приросте веса и изменений в поведении по сравнению с

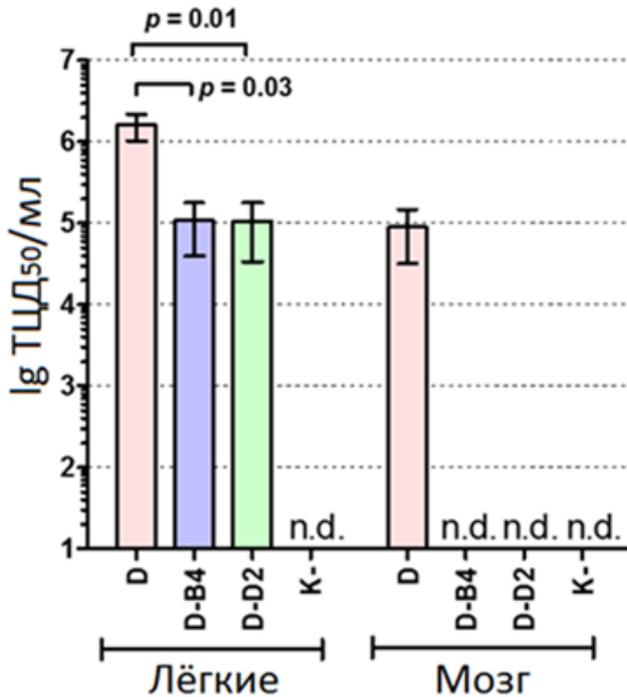
незараженными животными. Напротив, при заражении штаммом D в период со 2 по 6 день отмечалась достоверная задержка в приросте веса животных, достигавшая максимальных значений на 4 день – 13,4% ($p < 0,001$), что сопровождалось снижением аппетита, вялостью и сонливостью.



А. Титр вируса в клетках Vero CCL-81 на через 3 суток п.и. разными вариантами вируса при температуре культивирования 39⁰С. **Б.** Титр вируса в клетках Calu-3 через 3 суток п.и. при температуре культивирования 37⁰С, MOI 0,001 ТЦД₅₀ на клетку. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 7 – Маркеры аттенуации мутантов SARS-CoV-2 D-B4 и D-D2 *in vitro*

Репродуктивная активность штаммов D-B4 и D-D2 в легких и головном мозге хомячков была достоверно более низкой по сравнению со штаммом D. Инфекционная активность вируса в легких животных на 4 сутки после заражения мутантами D-B4 и D-D2 была на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (Рисунок 8). Инфекционный вирус в мозге при заражении *sa* мутантами обнаружен не был, тогда как при заражении штаммом D достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл гомогената (Рисунок 8). Наименьшая концентрация вирусной РНК в легких наблюдалась при заражении штаммом D-D2 - 6,5 lg копий РНК/мл, что на 1,6 lg ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Еще в большей степени снизилась репродуктивная активность штаммов D-B4 и D-D2 в мозге - на 2,2 и 3,2 lg, соответственно ($p < 0,01$).



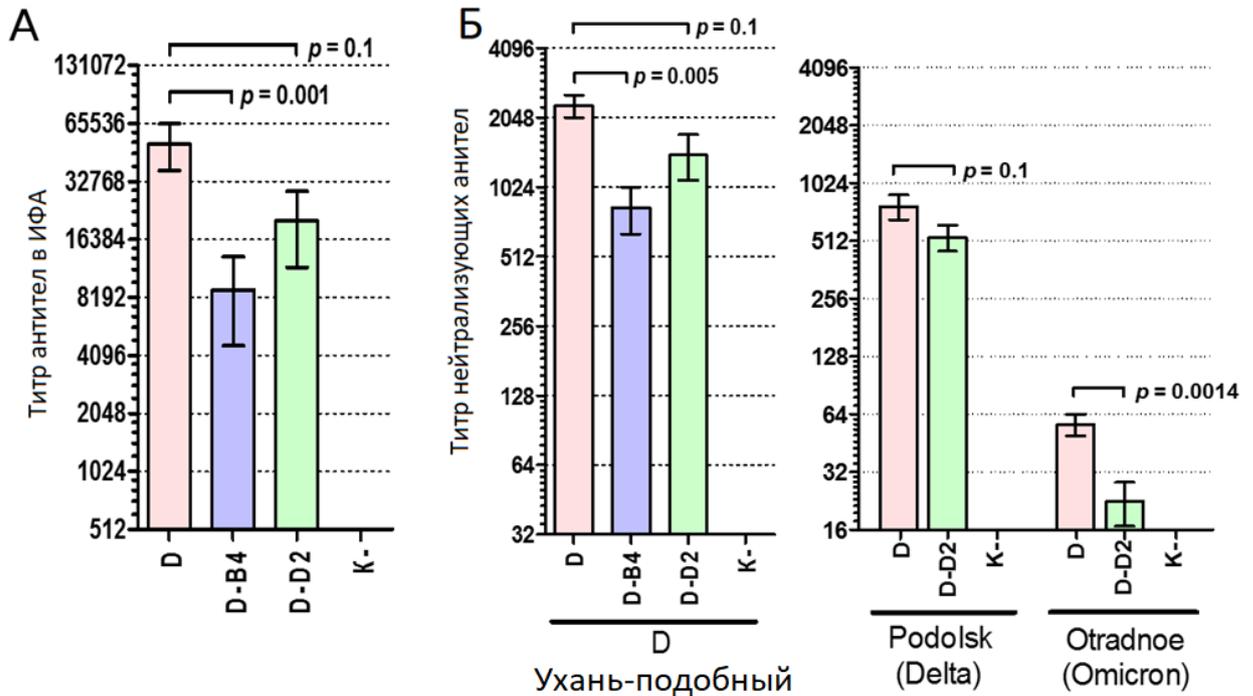
N=4/группу. Отрезки - SEM. Предел чувствительности – 2,0 lg TCID₅₀/мл. K - незараженные животные. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 8 - Титр вируса в гомогенатах легких и мозга хомячков, зараженных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 на 4 сутки п.и.

На 4 день после интраназального заражения в лёгких хомячков всех групп развивались воспалительные изменения. Однако между группами были отмечены существенные отличия по характеру, тяжести и распространённости воспалительных изменений. Так, при заражении штаммом D в лёгких хомячков развивалась долевая интерстициальная пневмония, которая сопровождалась выраженными альтеративными и воспалительными изменениями: обширные сливные безвоздушные зоны и участки со сниженной воздушностью общей площадью до 80% (визуальная оценка). При заражении хомячков штаммами D-B4 и D-D2 в лёгких наблюдали морфологическую картину очаговой интерстициальной пневмонии, распространённость которой была значительно ниже, чем в группе штамма D. При визуальной оценке очаги альвеолита занимали незначительную часть площади срезов (от отсутствия патологических изменений до поражения 30% площади) и содержали в себе небольшие безвоздушные очаги, которые часто располагались вокруг сосудов. В респираторном тракте отсутствовали признаки нарушения кровообращения (отёки, интраальвеолярные кровоизлияния) и выраженного повреждения межальвеолярных перегородок.

Через 21 день после однократной интраназальной иммунизации хомячков штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 в сыворотках крови иммунизированных животных методом ИФА обнаружены IgG к антигенам SARS-CoV-2 в титре 51200 ± 31353 , 8960 ± 3505 и 20480 ± 7011 , соответственно (Рисунок 9А). Вируснейтрализующая активность сывороток крови иммунизированных штаммами D-B4 и D-D2 хомячков (титр ВНА 1012 ± 740 и 1408 ± 701) лишь незначительно уступала группе, зараженной родительским штаммом D (2304 ± 572)

(Рисунок 9Б). Кроме того, была изучена вируснейтрализующая активность полученных сывороток в отношении гетерологичных вирусов, относящихся к вариантам Delta (штамм Podolsk) и Omicron (штамм Otradnoe). Нейтрализующая активность сывороток хомячков, иммунизированных штаммом D-D2, была снижена в 2,6 раза для варианта Delta ($p = 0,03$) и более чем в 60 раз для варианта Omicron ($p = 0,0014$) по сравнению с гомологичным штаммом D (Рисунок 9Б).

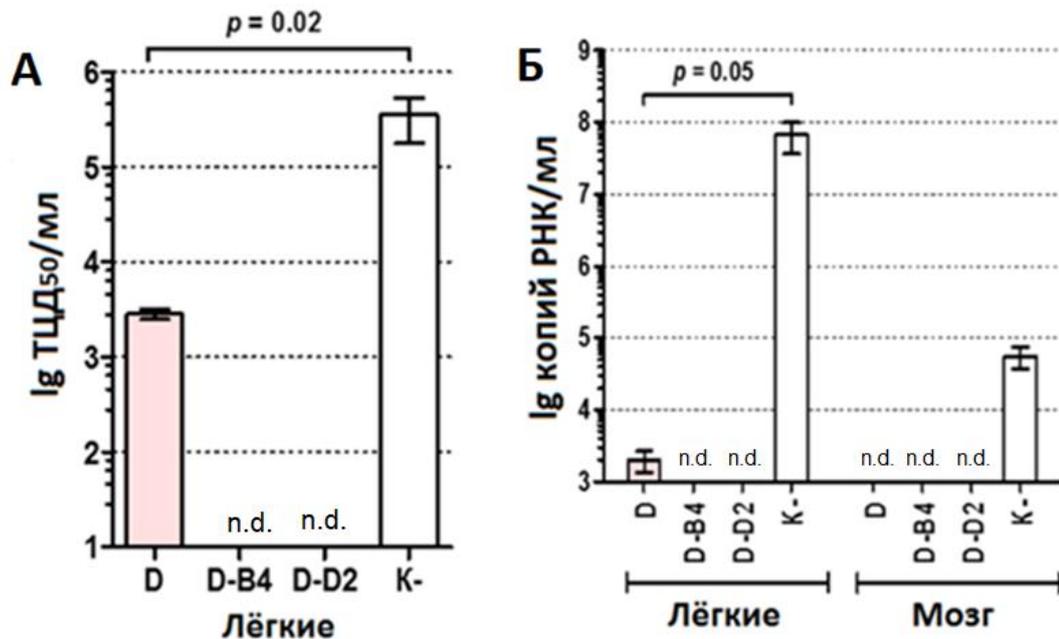


А. Титр суммарных IgG к SARS-CoV-2 в ИФА. Б. Титр вируснейтрализующих антител по отношению к штаммам D (Ухань-подобный), Podolsk (Delta), Otradnoe (Omicron). N=5/группу. Отрезки - SEM. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 9 – Титр антител через 21 день после иммунизации хомячков вариантами SARS-CoV-2

Для оценки протективной активности *са* мутантов хомячков, иммунизированных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2, и животных группы негативного контроля через 21 день п.и. заражали штаммом D в дозе 4,0 Ig ТЦД₅₀/голову. Через 4 суток п.и. животных гуманно умерщвляли, легкие, головной мозг и другие органы гомогенизировали и определяли в них титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Однократная интраназальная иммунизация мутантами D-B4 и D-D2 полностью защищала хомячков от заражения штаммом D, о чем свидетельствовало отсутствие вирусной репродукции в легких, головном мозге и других органах на 4 день п.и. (Рисунок 10). Примечательно, что у хомячков, иммунизированных штаммом D, стерильный иммунитет не сформировался - в легких животных данной группы на 4-й день п.и. выявлена

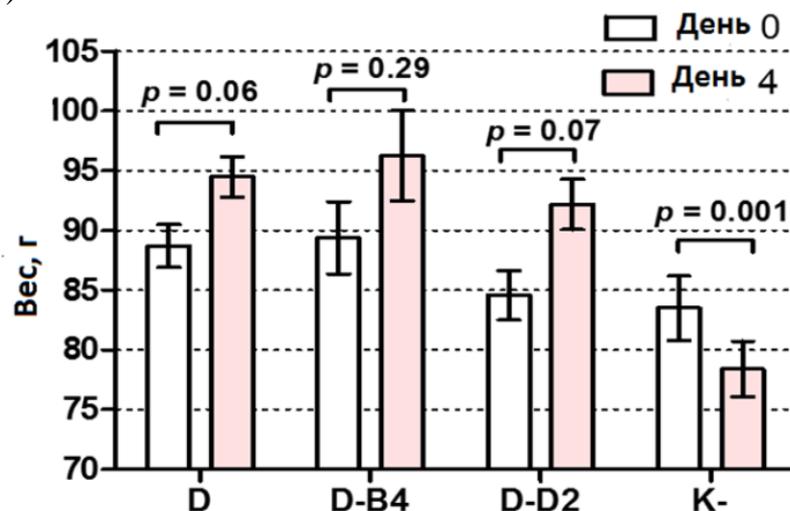
вирусная РНК и инфекционный вирус (в среднем 3,5 lg ТЦД₅₀/мл). В органах неиммунизированных животных вирусная РНК определялась, причем наибольшее содержание вируса было обнаружено в легких – в среднем 5,6 lg ТЦД₅₀/мл и 7,8 lg копий РНК/мл.



А. Титр вируса в легких и мозге. В. Концентрация вирусной РНК. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни. N=5/группу. Отрезки - SEM.

Рисунок 10 - Уровень вирусной репродукции в органах иммунизированных хомячков на 4 день после заражения штаммом D

После заражения штаммом D иммунизированные животные продолжали прибавлять в весе, тогда как неиммунизированные животные, напротив, теряли вес (Рисунок 11).



N=5/группу. Отрезки - SEM. K- – неиммунизированные животные. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 11 - Изменение веса хомячков, зараженных штаммом D

На 4 сутки п.и. морфологическая картина легких неиммунизированных хомячков соответствовала долевым вирусной интерстициальной пневмонии в фазе экссудации. При визуальной оценке гистологических срезов площадь сливных безвоздушных зон пневмонии достигала 80%. Выраженность воспалительных изменений в легких иммунизированных хомячков на 4 сутки п.и. штаммом D была значительно ниже, чем в контрольной группе. Площадь очагов альвеолита у животных, иммунизированных штаммом D-B4, составила 15-20%, тогда как у иммунизированных штаммом D-D2 достигала 30%.

В повторном эксперименте по иммунизации хомячков *ts* мутантом D-D2 степень патологических изменений в лёгких иммунизированных животных после заражения штаммом D выражали в баллах (Gruber A.D., 2021). У иммунизированных животных совокупный балл тяжести пневмонии составил в среднем 3,2 балла, в то время как у неиммунизированных животных 49,8, при максимально возможном количестве баллов 60. Таким образом, иммунизация хомячков штаммом D-D2 снижала совокупный балл тяжести при заражении родительским штаммом D в 15,7 раза ($p < 0,01$) (Файзулов Е.Б., 2024). Полученные нами результаты согласуются с данными аналогичных работ других авторов, где также показана высокая протективная активность *att* SARS-CoV-2 при интраназальной иммунизации сирийских хомячков или трансгенных мышей линии K18-hACE2 (Seo S.H., 2020; Okamura S., 2021; Abdoli M., 2022; Wang Y., 2021).

Высокая иммуногенность и протективная активность *ca/ts/att* Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 D-D2 была подтверждена в независимом эксперименте, где иммунизированных хомячков заражали не только родительским штаммом D, но и гетерологичными штаммами Podolsk (Delta, AY.122), Otradnoe (Omicron, сублиния BA.1.1) и FEB2 (Omicron, сублиния BA.5.2). Полученные результаты подтвердили формирование практически «стерильного» иммунитета, способного при однократной иммунизации защитить животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при заражении вирулентными штаммами вируса, в том числе гетерологичными (Файзулов Е.Б., 2024).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения диссертационной работы было исследовано биологическое разнообразие возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций - ротавирусов и папилломавирусов, а также разработаны научные основы получения *att* штаммов SARS-CoV-2, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью.

На начальных этапах работ на основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ разработаны тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей ОРВИ и ОКИ и экспериментально обоснована их высокая диагностическая эффективность. На основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и НПС разработаны новые подходы к генетической характеристике РВА, которые представляют собой не только эффективные инструменты эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции, но и могут стать основой методов контроля подлинности и специфической активности при производстве поливалентной ротавирусной вакцины.

Далее было исследовано биологическое разнообразие сезонных КВ человека, РВА и ВПЧ, циркулировавших на территории различных регионов РФ в последние годы. На территории московского региона выявлена циркуляция всех сезонных КВ человека, включая HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, чем подтвержден тезис об их убиквитарности. Установлено, что коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут вызывать тяжелые респираторные заболевания у детей в возрасте до 5 лет, требующие госпитализации. Полученные результаты дают основания для пересмотра существовавших ранее представлений об этиологической роли КВ человека, как о возбудителях заболеваний, протекающих преимущественно в легкой форме в виде простудного заболевания.

Анализ разнообразия циркулирующих на территории московского региона геновариантов РВА позволил определить основные тенденции в изменении структуры генотипов РВА и установить важную роль РВА животных и межвидовой передачи в появлении патогенных для человека РВА, имеющих эпидемический потенциал. Полученные результаты могут быть использованы при выработке рекомендаций по составу отечественной ротавирусной вакцины.

Установлено, что на территории РФ циркулируют все клинически значимые типы папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска и изучена их распространенность. Полученные данные о генетическом разнообразии ВПЧ представляют интерес при разработке ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют формулировать их состав с учетом региональных особенностей распространенности разных типов ВПЧ.

Следующий этап работ был направлен на разработку научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19. Выявлены факторы и маркеры снижения вирулентности вирусов краснухи и SARS-CoV-2. В частности, установлено, что адаптация этих вирусов к выращиванию в культуре клеток почки обезьяны Vero при пониженной температуре приводит к их аттенуации. Полногеномная характеристика *sa* мутантов вирусов краснухи и SARS-CoV-2 позволила выявить набор

нуклеотидных и аминокислотных замен, ассоциированных с приобретением *att* фенотипа. Разработаны методические подходы к выявлению маркеров аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2 в условиях *in vitro*, которые могут быть в использованы для контроля стабильности *att* фенотипа.

Установлено, что для SARS-CoV-2 приобретение *ts* фенотипа является не единственным условием для аттенуации вируса. В снижении вирулентности вируса важную роль играет также смена хозяина, которая приводит к снижению или утрате мутантным вирусом способности заражать клетки легких человека *in vitro*. Возможность аттенуации SARS-CoV-2 в результате холодовой адаптации, первоначально продемонстрированная на Ухань-подобном штамме D, в дальнейшем была подтверждена нами с использованием Omicron-подобного штамма FEB2 (сублиния BA.5.2) (Грачева А.В., 2024). В результате адаптации к росту в культуре клеток Vero при температуре 24°C штамм FEB2 приобрел *ca/ts/att* фенотип, утратив способность размножаться при температуре выше 37°C в культуре клеток и в легких хомячков, но, благодаря эффективному размножению в носовых ходах, сохранил иммуногенность.

Установлено, что однократная интраназальная иммунизация *ca* мутантами D-D2 и D-B4 вызывает у хомячков выработку вируснейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при заражении родительским штаммом D. Высокая иммуногенность и протективная активность Ухань-подобного *ts* мутанта D-D2 была подтверждена в независимом эксперименте с заражением иммунизированных хомячков как гомологичным штаммом D, так и гетерологичными штаммами Podolsk (Delta, AY.122), Otradnoe (Omicron, сублиния BA.1.1) и FEB2 (Omicron, сублиния BA.5.2) (Файзулов Е.Б., 2024). Полученные результаты подтвердили формирование практически «стерильного» иммунитета, способного при однократной иммунизации защитить животных от пневмонии при заражении как гомологичным, так и гетерологичными штаммами вируса.

Полученные результаты продемонстрировали, что холодовая адаптация вирусов краснухи и SARS-CoV-2, проводимая в клетках почки обезьяны Vero, является перспективной стратегией для получения кандидатных вакцинных штаммов этих вирусов. Важно отметить, что ВОЗ разрешает использование культуры клеток Vero для производства таких живых вакцин, как оральная полиомиелитная и ротавирусная вакцины.

Таким образом, задачи диссертационной работы успешно решены, а поставленная цель достигнута.

ВЫВОДЫ

1. На основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и НПС разработаны тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также генетической характеристики РВА.

2. Установлено, что основной причиной госпитализации с острым гастроэнтеритом в стационары г. Москвы и внутрибольничной кишечной инфекцией детей в возрасте до 5 лет в период с 2009 по 2014 гг. являлись РВА. Второй по клинической значимости группой кишечных вирусов были норовирусы.

3. Показано, что ключевой тенденцией в изменении генетической структуры РВА, циркулировавших на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг., было постепенное снижение частоты встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%), возрастание доли генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%), а также появление в период 2018-2020 гг. не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного штамма G3P[8]I2 (до 24%), имеющего животное происхождение.

4. Установлено, что на территории Российской Федерации циркулируют и широко представлены все известные папилломавирусы человека высокого онкогенного риска (ВПЧ16, 18, 26, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), а также ВПЧ низкого онкогенного риска (ВПЧ6, 11 и 44). В 2019 году в общей структуре доминировали ВПЧ16 - 13,8%, ВПЧ6 - 10,7%, ВПЧ51 - 6,8%, ВПЧ44 - 6,8%, ВПЧ53 - 6,3%, ВПЧ31 - 5,6%, ВПЧ56 - 5,5%, ВПЧ52 - 5,4%.

5. На территории московского региона выявлена циркуляция сезонных коронавирусов человека HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, что подтверждает тезис об их убиквитарности. Показано, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

6. Установлено, что вариант sa39 штамма C-77 вируса краснухи в результате холодной адаптации к культуре клеток Vero приобрел 6 аминокислотных замен, в том числе 4 уникальных, которые играют ключевую роль в приобретении вирусом *sa* и *att* фенотипа. По своим биологическим свойствам вариант sa39 может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной вакцины против краснухи.

7. Показано, что в результате адаптации к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной до +23°C температуре SARS-CoV-2 приобретает ряд несинонимичных мутаций в ORF неструктурных (nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp9, nsp10, nsp12, nsp16) и структурных (S, E, M) белков, определяющих его *att* фенотип. В снижении вирулентности вируса важную роль играют приобретение им температурной чувствительности и изменение видовой специфичности в результате адаптации к клеткам нового хозяина.

8. Установлено, что однократная интраназальная иммунизация золотистых сирийских хомячков *sa* мутантами SARS-CoV-2 вызывает сероконверсию с образованием нейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении вирулентным штаммом. Холодовая адаптация является перспективной стратегией получения *att* штаммов SARS-CoV-2, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью для чувствительного хозяина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные методические подходы к генетической характеристике РВА на основе метода НПС могут быть рекомендованы для внедрения в практику эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции. Результаты оценки распространенности разных генотипов РВА и ВПЧ на территории РФ рекомендуется учитывать при разработке соответствующих отечественных вакцин, что позволит определять их состав с учетом региональных особенностей антигенного разнообразия вирусов. Аттенуированный штамм вируса краснухи С-77 может быть рекомендован для изучения в качестве кандидатного вакцинного штамма для разработки на его основе отечественной ЖАВ против краснухи. Апробированные в диссертации методические подходы к аттенуации SARS-CoV-2 и выявлению маркеров аттенуации могут быть рекомендованы для разработки ЖАВ против COVID-19 и других коронавирусных заболеваний, а также для контроля стабильности фенотипа и генотипа вакцинных штаммов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты проведенных исследований представляют собой научный задел для проведения научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, направленных на совершенствование подходов к эпидемиологическому мониторингу и специфической профилактике приоритетных вакциноуправляемых инфекций. В частности, тест-системы для генетической характеристики РВА нуждаются в периодической оптимизации с учетом появления новых геновариантов вирусов и расширения знаний о реальном генетическом разнообразии патогенных для человека РВА. Разработанные подходы к получению *att* мутантов SARS-CoV-2, обладающих протективной активностью, представляют собой важный научный задел для создания ЖАВ против COVID-19. В качестве развития темы представляется целесообразным получение на основе аттенуированного мутанта SARS-CoV-2 молекулярного клона, обеспечивающего стабильность *att* фенотипа вируса, для использования его в качестве донора аттенуации. Это позволило бы методами генетической инженерии своевременно актуализировать в вакцинном штамме последовательности, кодирующие S-белок,

с учетом ожидаемых в предстоящем эпидемическом сезоне антигенных вариантов вируса, сохраняя при этом *att* фенотип вируса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Грачева А.В., Дроков А.О., Смирнова Д.И., Хохлова Д.М., Корчевая Е.Р., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Воронцова М.С., Ленева И.А., Свитич О.А., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Вирулентность и тканевая специфичность разных эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 для золотистых сирийских хомячков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2024. — Т. 101. — № 4. — С. 470-482. DOI: 10.36233/0372-9311-528 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).
2. **Файзулов Е.Б.**, Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Аммур Ю.И., Смирнова Д.И., Хохлова Д.М., Дроков А.О., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Воронцова М.С., Ленева И.А., Свитич О.А., Зверев В.В. / Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрёстную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2024. — Т. 101. — № 1. — С. 36-51. DOI: 10.36233/0372-9311-496 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).
3. Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Дьяков И.Н., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2023. — Т. 100. — № 3. — С. 225-236 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).
4. **Faizuloev E.**, Gracheva A., Korchevaya E., Smirnova D., Samoilkov R., Pankratov A., Trunova G., Khokhlova V., Ammour Y., Petrusha O., Poromov A., Leneva I., Svitich O., Zverev V. / Cold-adapted SARS-CoV-2 variants with different temperature sensitivity exhibit an attenuated phenotype and confer protective immunity // Vaccine. — 2023. — Vol. 41. — N. 4. — P. 892-902. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.12.019. (Web of Science, Scopus, PubMed, Q1)
5. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Y.I., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Zubarev I.V., Samoilkov R.V., Leneva I.A., Svitich O.A., Zverev V.V., **Faizuloev E.B.** / Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light // Archives of Virology. — 2022. — Vol. 167. — N. 11. — P. 2181-2191. DOI: 10.1007/s00705-022-05530-7 (Scopus, Springer, PubMed, Q3).
6. **Файзулов Е.Б.**, Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Самойликов Р.В., Смирнова Д.И., Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В., Ленева И.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А., Зверев В.В. / Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99. — № 4. — С. 397-409. DOI: 10.36233/0372-9311-280 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).

7. Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Самойликов Р.В., Смирнова Д.И., Ленева И.А., Поромов А.А., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Маркеры аттенуации холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 // Медицинский академический журнал. — 2022. — Т. 22. — № 2. — С. 79-88. DOI: 10.17816/MAJ108725 (RSCI, Scopus, ВАК, K2).
8. Ленева И.А., Смирнова Д.И., Карташова Н.П., Грачева А.В., Иванина А.В., Глубокова Е.А., Корчевая Е.Р., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Свитич О.А., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Сравнительное изучение Ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях // Вопросы вирусологии. — 2022. — Т. 67. — № 5. — С. 439-449. DOI: 10.36233/0507-4088-135 (RSCI, Scopus, PubMed, ВАК, K1)
9. Петруша О.А., Корчевая Е.Р., Минтаев Р.Р., Исаков И.Ю., Никонова А.А., Мескина Е.Р., Ушакова А.Ю., Хадисова М.К., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99. — № 1. — С. 7-19. DOI: 10.36233/0372-9311-208 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).
10. Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — Т. 98. — № 3. — С. 253-265. DOI: 10.36233/0372-9311-136 (RSCI, Scopus, ВАК, K1).
11. **Файзулов Е.Б.**, Каира А.Н., Узбеков Т.Р., Поромов А.А., Волынская Е.А., Свитич О.А., Зверев В.В. / Распространенность папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска на территории Российской Федерации // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2021. — Т. 39. — № 4. — Р. 39-47. DOI: 10.17116/molgen20213904139 (RSCI, Springer, PubMed, ВАК, K1).
12. Никонова А.А., **Файзулов Е.Б.**, Грачева А.В., Исаков Ю.И., Зверев В.В. / Генетическое разнообразие и эволюция биологических свойств коронавируса SARS-CoV-2 в условиях глобального распространения // Acta Naturae. — 2021. — Т. 13. — № 3. — Р. 77-89. DOI: 10.32607/actanaturae.11337 (RSCI, PubMed, Q4).
13. **Faizuloev E.**, Mintaev R., Petrusha O., Marova A., Smirnova D., Ammour Y., Meskina E., Sergeev O., Zhavoronok S., Karaulov A., Svitich O., Zverev V. / New approach of genetic characterization of group A rotaviruses by the nanopore sequencing method // Journal of Virological Methods. — 2021. — Vol. 292. — Р. 114114 (Scopus, PubMed, Q3).
14. Каира А.Н., **Файзулов Е.Б.**, Лавров В.Ф., Свитич О.А., Соломай Т.В., Никонова А.А., Петруша О.А. / Эпидемиологические тенденции заболеваемости и вопросы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции на

- современном этапе // Санитарный врач. — 2020. — № 6. — С. 17-29. DOI: 10.33920/med-08-2006-02 (ВАК, К3).
15. Kiseleva V., **Faizuloev E.**, Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., Bakhtoyarov G., Vochkareva N., Filatov N., Linok A., Ammour Y., Zverev V. / Molecular-Genetic Characterization of Human Rotavirus A Strains Circulating in Moscow, Russia (2009–2014) // *Virologica Sinica*. — 2018. — Vol. 33. — N. 4. — P. 304-313. DOI: 10.1007/s12250-018-0043-0 (Scopus, Springer, Q3).
 16. Мескина Е.Р., Ушакова А.Ю., **Файзулов Е.Б.**, Бахтояров Г.Н., Киселева В.В. Сравнительная характеристика гастроэнтерита, вызванного ротавирусами генотипов G4P[8] и G9P[8], у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы (эпидсезон 2012–2013 гг.) // *Инфекционные болезни*. — 2017. — Т. 15. — № 1. — С. 23-28. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-1-23-28 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 17. Филатов Н.Н., Линок А.В., **Файзулов Е.Б.** / Некоторые особенности проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях в городе Москве // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2016. — № 1. — С. 17-21 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 18. Лободанов С.А., Киселев И.С., Аммур Ю.И., Горбаленя А.Е., Claas E.C.J., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г. // *Вопросы вирусологии*. — 2015. — Т. 60. — № 3. — С. 31-36 (RSCI, Scopus, PubMed, ВАК, К1).
 19. Бахтояров Г.Н., Киселев И.С., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Оценка эффективности применения мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для генотипирования ротавирусов группы А // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2014. — № 4. — С. 43-49 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 20. Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., **Файзулов Е.Б.**, Десяткова Р.Г., Зверев В.В. / Генетические детерминанты аттенуации вируса краснухи // *Вопросы вирусологии*. — 2014. — Т. 59. — № 6. — С. 12-15 (RSCI, Scopus, PubMed, ВАК, К1).
 21. Ammour Y., **Faizuloev E.**, Borisova T., Nikonova A., Dmitriev G., Lobodanov S., Zverev V. / Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay // *Journal of Virological Methods*. — 2013. — Vol. 187. — N. 1. — P. 57-64. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.09.011 (Scopus, Q2).
 22. **Файзулов Е.Б.**, Лободанов С.А., Никонова А.А., Каира А.Н., Полухина Г.М., Трушакова С.В., Шевченко Е.С., Калинкина М.А., Зверев В.В. / Дифференциальная диагностика ОРВИ методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. — 2012. — № 1. — С. 12-19 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 23. Дмитриев Г.В., Забияка Ю.И., **Файзулов Е.Б.**, Борисова Т.К., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. / Выявление маркеров аттенуации отечественного

- холодоадаптированного штамма С-77 вируса краснухи // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2012. — № 1. — С. 69-72 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
24. Дмитриев Г.В., Борисова Т.К., **Файзулов Е. Б.**, Забияка Ю.И., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. / Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77 // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2012. — № 3. — С. 28-34. (RSCI, Springer, PubMed, ВАК, К1).
 25. Бахтояров Г.Н., Лободанов С.А., Марова А.А., Мескина Е.Р., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Определение генетической структуры ротавирусов группы А, циркулирующих в Московском регионе, методом ПЦР в режиме реального времени. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2012. — № 6. — С. 35-39 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 26. Лободанов С.А., Никонова А.А., **Файзулов Е.Б.**, Трушакова С.В., Забияка Ю.И., Калинкина М.А., Иванова В.Т., Шевченко Е.С., Зверев В.В., Бурцева Е.И. / Оценка эффективности дифференциальной диагностики гриппа методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. // Вопросы вирусологии. — 2012. — Т. 57. — № 1. — С. 42-45 (RSCI, Scopus, PubMed, ВАК, К1).
 27. Марова А.А., Оксанич А.С., Каира А.Н., Мескина Е.Р., Медведева Е.А., Иванова О.Е., Лукашев А.Н., Кюрегян К.К., Калинкина М.А., Егорова О.В., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Опыт применения метода мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики кишечных вирусных инфекций. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2012. — № 6. — С. 39-45 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 28. Лободанов С.А., **Файзулов Е.Б.**, Никонова А.А., Забияка Ю.И., Каира А.Н., Зверев В.В. / Этиология ОРВИ: новые аспекты // Санитарный врач. — 2011. — № 10. — С. 049-052 (ВАК, К3).
 29. Лободанов С.А., Никонова А.А., Полухина Г.М., Забияка Ю.И., Фильченкова Ф.Э., Каира А.Н., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Роль риновирусов и коронавирусов в этиологии ОРВИ. // Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра Сибирского Отделения Российской Академии Медицинских Наук. — 2011. — № 3-1 (79). — С. 165-167 (RSCI, ВАК, К1).
 30. Забияка Ю.И., **Файзулов Е.Б.**, Борисова Т.К., Никонова А.А., Зверев В.В. / Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирусосодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2010. — № 5. — С. 57-62 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 31. Никонова А.А., Успенская Е.С., Лободанов С.А., Оксанич А.С., Горбаленя А.Е., Claas E.C.J., Фошина Е.П., Каира А.Н., Зверев В.В., **Файзулов Е.Б.** / Применение метода мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 1. — С. 67-70 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
 32. Оксанич А.С., **Файзулов Е.Б.**, Никонова А.А., Каширин В.И., Лотте В.Д., Иванова О.Е., Зверев В.В. / Мультиплексная ПЦР в режиме реального

- времени для быстрого выявления энтеровирусов, аденовирусов и вируса гепатита А в клинических образцах. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2007. — № 5. — С. 65-70 (RSCI, Scopus, ВАК, К1).
33. **Файзулов Е.Б.**, Никонова А.А., Оксанич А.С., Борисенко А.С., Зверев В.В. / Разработка ПЦР тест-системы для выявления аденовирусной инфекции у человека. // Вопросы вирусологии. — 2005. — № 6. — С. 44-46 (RSCI, Scopus, PubMed, ВАК, К1).
34. Патент № RU 2460803 С2 Российская Федерация. Способ дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления : N 2010143681/10 : заявл. 27.10.2010 : опубликовано 10.09.2012 / **Файзулов Е.Б.**, Никонова А.А., Оксанич А.С., Лободанов С.А., Малахо С.Г., Зверев В.В. ; заявитель Минпромторг России. - 17 с. : ил. - Текст: непосредственный.
35. Патент № RU2506317 Российская Федерация. Способ выявления кишечных вирусов в клинических образцах и воде методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления : N 2012115031/10 : заявл. 17.04.2012 : опубликовано 27.10.2013 / Оксанич А.С., **Файзулов Е.Б.**, Марова А.А., Никонова А.А., Зверев В.В., Егорова О.В., Калинин М.А. ; заявитель Минпромторг России. - 19 с. : ил. - Текст: непосредственный.