

Мансур Ула

**Генетическое разнообразие и молекулярный анализ вирусов парагриппа человека,
циркулировавших в Санкт-Петербурге в период с 2017 по 2025 год**

1.5.10. ВИРУСОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Даниленко Дарья Михайловна

кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Шестопалов Александр Михайлович

доктор биологических наук, директор научно-исследовательского института вирусологии ФГБУ «Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины»

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится ____ декабря 2026 года в ____ часов 00 минут на заседании диссертационного совета ДС 21.1.017.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), Тел.: (812) 499 15 00;

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2026 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДС 21.1.017.01

Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) остаются одной из ведущих причин заболеваемости во всём мире, особенно среди детей раннего возраста, пожилых людей и пациентов с иммунодефицитными состояниями (Lozano et al., 2012). Среди их этиологических агентов важное место занимают вирусы парагриппа человека (human parainfluenza viruses, hPIV), способные вызывать широкий спектр заболеваний верхних и нижних дыхательных путей — от лёгких респираторных инфекций до крупа, бронхоолита и пневмонии (Henrickson et al., 2003). Наибольшее клиническое значение hPIV имеют в педиатрической практике: у госпитализированных детей инфекции, вызванные hPIV, составляют существенную долю случаев ОРВИ и являются одной из ведущих причин крупа. У пожилых пациентов и лиц с иммунодефицитными состояниями эти инфекции могут протекать тяжело и приводить к развитию пневмонии (Karron et al., 2013).

Вирусы парагриппа человека подразделяются на четыре типа (hPIV1–4), различающиеся по генетическим, антигенным и эпидемиологическим характеристикам. Согласно современной классификации международного Комитета по таксономии вирусов ICTV, hPIV1 и hPIV3 относятся к роду *Respirovirus*, а hPIV2 и hPIV4 относятся к роду *Orthorubulavirus*. Среди вирусных белков особое значение имеет поверхностный гликопротеин гемагглютинин-нейраминидаза (HN), обеспечивающий прикрепление вируса к клеткам хозяина, участие в процессе мембранного слияния и выходе вирусных частиц из инфицированных клеток. Благодаря своим биологическим функциям и антигенной вариабельности ген HN широко использовался в молекулярно-эпидемиологических и филогенетических исследованиях hPIV (Porotto et al., 2005, Almajhdi et al., 2012).

Несмотря на признанную медицинскую значимость вирусов hPIV, объём доступной информации об их геномах остаётся ограниченным. Большинство последовательностей, представленных в международных базах данных, соответствует отдельным фрагментам генома, чаще всего гену HN, и характеризуется неравномерным географическим распределением. Это затрудняет комплексную оценку генетического разнообразия hPIV, ограничивает возможности сопоставления штаммов, выявленных в различных регионах мира, и снижает информативность молекулярно-эпидемиологического анализа. В связи с этим получение полногеномных последовательностей имеет особое значение, поскольку позволяет проводить более детальную характеристику вирусных геномов, выявлять генетические варианты, события рекомбинации и анализировать циркулирующие штаммы в глобальном филогенетическом контексте.

В Российской Федерации систематический геномный мониторинг вирусов парагриппа человека до выполнения настоящего исследования не проводился, комплексные молекулярно-генетические данные о циркулирующих штаммах практически отсутствовали. В этой связи получение и анализ полных геномных последовательностей hPIV1–4, циркулирующих в Санкт-Петербурге, разработка подходов к их полногеномному секвенированию и характеристика их

генетического разнообразия представляют собой актуальную научную задачу, имеющую значение для развития молекулярной эпидемиологии и геномного надзора за респираторными вирусами, а её решение будет способствовать здоровьесбережению нации.

Степень разработанности проблемы

Молекулярно-эпидемиологические исследования вирусов парагриппа человека в течение длительного времени основывались преимущественно на анализе отдельных геномных регионов, прежде всего гена HN. Такой подход позволил описать основные филогенетические группы hPIV1–4, изучить их циркуляцию в отдельных странах и выявить ряд закономерностей генетической диверсификации вирусов (Mao et al., 2012). Вместе с тем, анализ одного гена не всегда позволяет полноценно оценить геномное разнообразие вируса, сопоставить эволюционные изменения в разных участках генома и охарактеризовать молекулярные особенности циркулирующих штаммов на уровне полного генома.

В последние годы полногеномное секвенирование стало всё активнее применяться для изучения hPIV, однако количество доступных полных геномов остаётся ограниченным по сравнению с другими респираторными вирусами, а географическая представленность данных остаётся неравномерной (Bose et al., 2019, Zhu et al., 2024). Кроме того, число опубликованных и валидированных подходов для эффективного получения полных геномов hPIV непосредственно из клинического материала ограничено, что существенно сужает возможности рутинного геномного мониторинга этих вирусов (Smielewska et al., 2018, Bisi et al., 2026).

В отношении генетических данных вирусов парагриппа человека, циркулирующих в Российской Федерации до настоящего исследования, имелся значительный пробел: полногеномные данные hPIV1–4 практически отсутствовали, их генетическое разнообразие оставалось неизученным. Таким образом, проблема молекулярно-генетической характеристики вирусов парагриппа человека, циркулирующих на территории России, оставалась слабо разработанной. Исследования, посвященные выделению и биологической характеристике современных изолятов hPIV всех четырех типов, также не проводились. Учитывая вышеизложенное, были определены цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования – комплексный полногеномный молекулярно-генетический анализ вирусов парагриппа человека типов 1–4, циркулировавших в Санкт-Петербурге в течение восьми эпидемических сезонов с 2017 по 2025 гг.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выделение вирусов парагриппа человека в культурах клеток MA-104 и LLC-MK2, характеристика их биологических свойств, оценка адаптационных изменений в геноме вирусов при их культивировании, формирование коллекции вирусных изолятов и выбор современных типовых представителей hPIV 1-4.
2. Разработка и валидация панелей праймеров для полногеномной амплификации и секвенирования современных вирусов парагриппа человека с использованием технологий секвенирования нового поколения (NGS).

3. Проведение сравнительного филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей hPIV в сравнении с референсными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, на основе анализа полных геномов и гена HN.
4. Определение характерных аминокислотных замен, специфичных для выделенных филогенетических групп вирусов hPIV1–4.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование вирусов парагриппа, циркулировавших в эпидемических сезонах 2017-2025 гг. в Санкт-Петербурге. Впервые получены полногеномные последовательности для вирусов парагриппа 4 типа с применением метода метагеномной амплификации SMART-9N. Показано, что амплификация SMART-9N обеспечивает надежную реконструкцию полных геномов hPIV4, пригодных для последующего молекулярного и филогенетического анализа.

Впервые в Российской Федерации проведен подробный филогенетический анализ вирусов парагриппа для полученных полногеномных последовательностей и доказано, что вирусы парагриппа человека типов 1–4, циркулировавшие в Санкт-Петербурге, относятся к глобально распространённым филогенетическим группам и характеризуются значительным внутритиповым генетическим разнообразием. При анализе полных геномных последовательностей вируса парагриппа 3 типа впервые выявлен и описан новый отдельный кластер, обозначенный как кластер D, в состав которого вошли недавно выявленные штаммы из Франции, Германии, Пакистана, Сингапура и Малайзии, США и семь штаммов из России, что свидетельствует о недавней глобальной циркуляции ранее неописанной в литературе генетической группы.

Впервые в России проведен анализ рекомбинационных событий для вирусов парагриппа 1-4 типов с использованием полногеномных последовательностей. Установлено, что для hPIV1 и hPIV4 статистически подтверждённых событий рекомбинации не происходило, а для hPIV2 и hPIV3 эти события единичны.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в комплексной характеристике полных геномов вирусов hPIV1–4, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга. Проведённый полногеномный филогенетический анализ позволил определить положение российских штаммов среди глобально циркулирующих вариантов и выявить характерные молекулярные особенности отдельных филогенетических групп. Для выявленного кластера D hPIV3 наиболее выраженные молекулярные особенности наблюдались в генах P, HN, F и L, что подтверждает его генетическую обособленность по сравнению с ранее описанными кластерами hPIV3. Показана сходимость результатов филогенетического анализа для гена HN иерархической структуре, выявленной при анализе полных геномов вирусов парагриппа 1-4.

Наиболее значимой практической ценностью работы является разработка и валидация панели праймеров для полногеномной амплификации вирусов hPIV1–3. Разработанные праймерные системы представляют собой оригинальный методический подход и защищены

патентами (патент № 2833687; патент № 2859039). Получены 453 (105 hPIV1, 37 hPIV2, 303 hPIV3 и 8 hPIV4) полногеномные последовательности вирусов парагриппа человека, все они депонированы в международную базу GenBank, что позволило существенно увеличить репрезентативную выборку полных геномов парагриппа в глобальном масштабе и впервые депонировать полногеномные последовательности вирусов парагриппа всех 4 типов из России.

Сформирована коллекция современных изолятов вирусов парагриппа всех типов на клеточных линиях МА-104 и LLC-MK2; впервые в России выделен современный представитель hPIV 4 типа. Типовые изоляты hPIV 1-4 депонированы в Государственную коллекцию вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Результаты проведенного диссертационного исследования сформировали методические, геномные и биологические подходы к изучению современных вирусов парагриппа человека всех типов, которые могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях и эпидемиологическом мониторинге за возбудителями как в России, так и на международном уровне.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели использовали комплексный молекулярно-генетический, вирусологический и биоинформатический подход к изучению вирусов парагриппа человека типов 1–4. Исследование включало анализ клинических материалов, полученных в рамках госпитального надзора за гриппом и ОРВИ (протокол локального этического комитета ФГБУ «НИИ гриппа им. Смородинцева» Минздрава России, № 152 от 18 июня 2020 г.). Все работы были выполнены на базе отдела этиологии и эпидемиологии лабораторий молекулярной вирусологии и этиологии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России с соблюдением требований СанПиН 3.3686-21. В настоящем исследовании были использованы современные вирусологические, молекулярно-биологические, биоинформатические и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Современные изоляты четырёх типов вирусов парагриппа человека сохраняют ранее описанные для каждого типа биологические свойства и демонстрируют генетическую стабильность при краткосрочном культивировании.
2. Разработанные панели праймеров обеспечивают полногеномную амплификацию вирусов парагриппа человека типов hPIV1–3 из клинического материала и позволяют оценить генетическое разнообразие hPIV.
3. Популяционная структура вирусов парагриппа человека, циркулирующих на территории России, распределена в глобальном филогенетическом контексте и не образует географически обособленных кластеров.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении основных экспериментальных, биоинформатических и аналитических этапов исследования. Автором разработаны и валидированы панели праймеров для полногеномной амплификации вирусов парагриппа человека типов hPIV1–3, выполнены все этапы по амплификации вирусов парагриппа, проведены эксперименты по выделению вирусов парагриппа человека в культурах клеток МА-104 и LLC-MK2. Подготовка библиотек для секвенирования и проведение секвенирования на платформах NGS осуществлялись сотрудниками лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смординцева» Минздрава России.

Автором выполнена биоинформатическая обработка данных секвенирования, сборка вирусных геномов, контроль качества последовательностей, филогенетический анализ, расчёт генетических расстояний, анализ аминокислотных вариаций, выявление потенциальных событий рекомбинации и прогнозирование потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Визуализация отдельных результатов исследования на основе подготовленных автором данных выполнялась совместно с сотрудником лаборатории молекулярной вирусологии А.А. Передерием с использованием специализированных скриптов в среде RStudio.

Автором проведены анализ и интерпретация полученных результатов, включая оценку филогенетических взаимосвязей, подготовку рисунков и таблиц, а также формулирование основных научных выводов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается адекватностью использованных методов, соответствующих целям и задачам исследования, воспроизводимостью результатов, полученных в ходе работы, а также применением статистической обработки полученных данных. Все исследования проводились на современном поверенном оборудовании с использованием высококачественных реагентов.

Основные результаты исследования были представлены на ряде российских и международных научных конференций, в том числе в форме устных докладов и стендовых сообщений. Результаты были доложены и обсуждены на Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2023); X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2023); XVI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 2024); V Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2024); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024» (Москва, 2024); Конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2024); XI Международной конференции молодых ученых — биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (Новосибирск, 2024); XII Международной конференции молодых ученых — биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (Новосибирск, 2025); VIII Российско-Китайском форуме по инфекционным заболеваниям (Санкт-Петербург, 2025).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 4,8 и 9 паспорта специальности 1.5.10 Вирусология.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ: 4 научные статьи в международных журналах, индексируемых в базе данных Scopus (International Journal of Molecular Sciences, Viruses, The Lancet Global Health), и 1 статья в другом научном журнале, а также 2 патента Российской Федерации на разработанные панели праймеров для полногеномной амплификации вирусов парагриппа человека hPIV1–3.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста, включает 25 таблиц, 30 рисунков и дополнительные материалы, иллюстрирующие полученные результаты, и размещенные в связи с большим объёмом данных на Яндекс Диске (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybnstBwLA>). Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы содержит 247 источников, из которых 11 являются отечественными.

Финансовая поддержка

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Комплексный подход к генетической характеристике и ранней идентификации патогенов с эпидемическим и пандемическим потенциалом с использованием метагеномного секвенирования» (рег.№ НИОКТР 124020500002-4).

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

В исследовании использовали назофарингеальные и орофарингеальные мазки, полученные от госпитализированных пациентов в Санкт-Петербурге в течение эпидемических сезонов 2017/18–2024/25 гг. Образцы собирали в рамках госпитального надзора за гриппом и ОРВИ, доставляли в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол локального этического комитета ФГБУ «НИИ гриппа им. Смородинцева» Минздрава России, № 152 от 18 июня 2020 г.). В работе также использовали референсные штаммы hPIV1–4 и клеточные линии MA-104 и LLC-MK2.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием автоматизированных систем экстракции. Первичный скрининг респираторных вирусов выполняли методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих диагностических наборов. Образцы, положительные на hPIV, использовали для дальнейшей полногеномной амплификации, секвенирования и, в отдельных случаях, выделения вируса в клеточной культуре.

Для полногеномной амплификации *hPIV1*, *hPIV2* и *hPIV3* были разработаны панели праймеров, основанные на множественном выравнивании доступных полных геномов соответствующих типов *hPIV*. Схемы включали перекрывающиеся ампликоны, покрывающие практически весь вирусный геном. Разработанные панели были оценены по специфичности, аналитической чувствительности и робастности с использованием клинических образцов, вирусных изолятов, референсных штаммов и образцов, положительных на другие респираторные вирусы. Полногеномную амплификацию *hPIV1–3* проводили методом мультиплексной ПЦР с двумя пулами праймеров, после чего объединённые ампликоны использовали для подготовки библиотек NGS.

Для получения полных геномов *hPIV4* применяли метагеномный подход SMART-9N, основанный на амплификации вирусной РНК без использования вирус-специфичных праймеров. Такой подход был выбран с учётом генетической гетерогенности *hPIV4* и наличия двух генетически отличных подтипов — *hPIV4a* и *hPIV4b*. Поскольку информация о циркуляции отдельных подтипов *hPIV4* в России отсутствовала, разработка двух дополнительных ампликонных панелей была признана нецелесообразной. Полногеномное секвенирование проводили с использованием платформ MGI DNBSEQ-G400 и Illumina NextSeq 2000.

Выделение вирусов парагриппа человека проводили в культурах клеток LLC-MK2 и MA-104. Для этого использовали *hPIV*-положительные образцы со значениями $Ct < 25$. Репликацию вируса оценивали по развитию цитопатического действия, а наличие вируса подтверждали методом ОТ-ПЦР. Полученные изоляты дополнительно характеризовали с использованием реакции гемагглютинации, реакции торможения гемагглютинации, реакции нейтрализации и определения инфекционного титра методом $TCID_{50}$.

Биоинформатический анализ включал картирование прочтений на референсные геномы, сборку консенсусных последовательностей, расчёт метрик покрытия и множественное выравнивание. В последующий анализ включали только последовательности, имевшие покрытие не менее чем 95% длины генома и медианной глубиной секвенирования не менее 10×. Референсные полногеномные последовательности *hPIV1–4* были загружены из базы данных GenBank; для анализа отбирали последовательности высокого качества без крупных внутренних разрывов и с минимальным числом неопределённых нуклеотидов.

Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия с оценкой поддержки ветвей по 1000 бутстреп-репликатам. Для крупных наборов данных *hPIV1* и *hPIV3* дополнительно применяли инструмент Treenmer для формирования репрезентативных подвыборок с сохранением филогенетического разнообразия. Генетическую дивергенцию оценивали на основе средних попарных генетических расстояний. Дополнительно для всех четырёх типов *hPIV* были построены филогенетические деревья на основе полного гена HN; аминокислотные замены анализировали с использованием реконструкции предковых состояний. Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN прогнозировали с использованием NetNGlyc. Возможные события рекомбинации анализировали с использованием

программы RDP5, включающей набор алгоритмов для выявления рекомбинационных сигналов в нуклеотидных последовательностях.

Статистический анализ выполняли в среде RStudio с применением методов описательной статистики, критерия χ^2 , точного критерия Фишера и поправки Бенджамини–Хохберга.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Распространенность вируса парагриппа человека

В период с октября 2017 г. по сентябрь 2025 г. в рамках госпитального мониторинга в Санкт-Петербурге было исследовано 24824 респираторных образца. Вирусы парагриппа человека были обнаружены в 1645 образцах (из 14334 положительных на ОРВИ, что составляет 11,48%) (Рисунок 1). Наиболее распространённым типом являлся hPIV3, на долю которого приходилось 1217 случаев (74%) среди всех образцов, положительных на hPIV. Значительно реже регистрировались hPIV1 — 207 случаев (13%), hPIV2 — 129 случаев (8%) и hPIV4 — 92 случая (6%). Одновременное выявление более чем одного типа hPIV не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о значимом вкладе вирусов парагриппа человека в структуру ОРВИ в Санкт-Петербурге, потребовавших госпитализации, и подтверждают доминирующую роль hPIV3 среди циркулирующих типов вируса парагриппа человека.

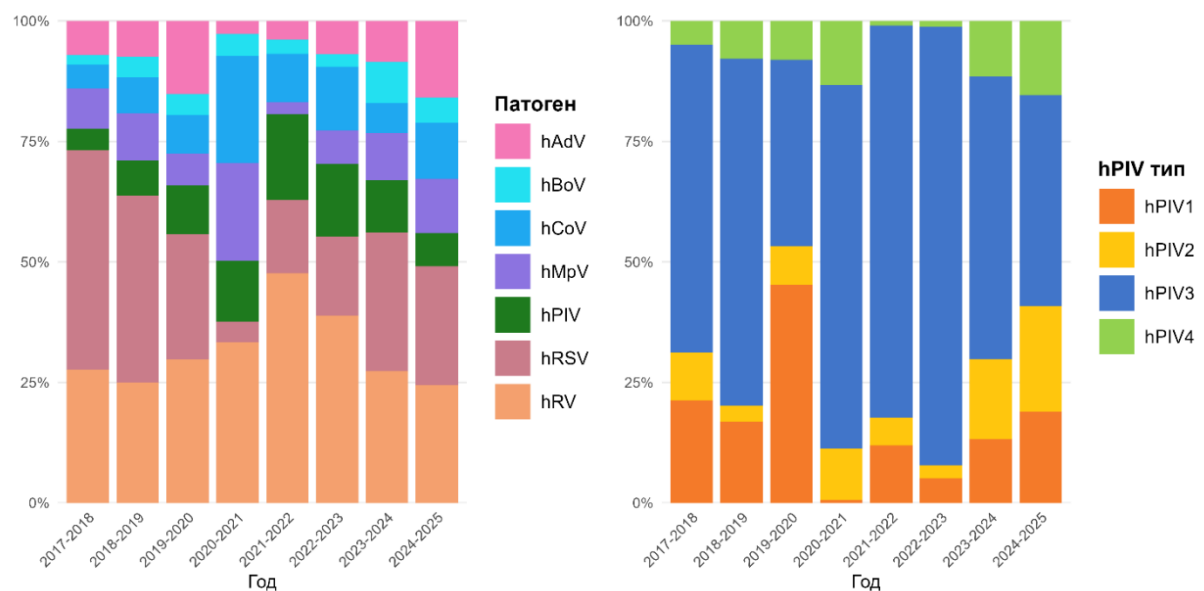


Рисунок 1. Эпидемиологический мониторинг острых респираторных вирусных инфекций в Санкт-Петербурге, 2017–2025 годы. Левая панель: Доля всех выявленных респираторных вирусов в исследуемый период; hAdV — аденовирус человека, hBoV — бокавирус человека, hCoV — сезонный коронавирус человека, hMPV — метапневмовирус человека, hPIV — вирус парагриппа человека, hRSV — респираторно-синцитиальный вирус человека, hRV — риновирус человека. Правая панель: Доля отдельных типов вируса парагриппа человека (hPIV1–4) в составе образцов, положительных в ПЦР на hPIV.

2.2.Выделение вирусов в клеточной культуре LLC-MK2 и MA-104

Для выделения вирусов в клеточной культуре была отобрана подгруппа hPIV-положительных образцов с высокой вирусной нагрузкой ($Ct < 25$), собранных в различные эпидемические сезоны. Всего на монослой клеток LLC-MK2 и MA-104 было инокулировано 30 образцов hPIV1, 25 — hPIV2, 30 — hPIV3 и 25 — hPIV4. Успешное выделение вируса было достигнуто для 26/30 (87 %) образцов hPIV1, 10/25 (40 %) образцов hPIV2, 12/30 (40 %) образцов hPIV3 и 8/25 (32 %) образцов hPIV4. Цитопатическое действие развивалось преимущественно на 6–7 сутки после заражения для hPIV1–3 и на 14–21 сутки для hPIV4. Наблюдаемые изменения включали округление клеток, образование синцитиев, прогрессирующее разрушение и отслоение клеточного монослоя. Успешное размножение вируса в клеточной культуре было подтверждено методом ОТ-ПЦР в реальном времени по снижению значений Ct в культуральных супернатантах после пассирования по сравнению с исходными клиническими образцами.

Реакция гемагглютинации (РГА) с 0,5 % эритроцитами морской свинки выявила титры 1:2–1:64 для изолятов hPIV1, 1:2–1:32 для hPIV2 и 1:8–1:128 для hPIV3. Изоляты hPIV4 не обладали гемагглютинирующей активностью, что соответствовало литературным данным. Инфекционная активность типовых изолятов hPIV1–4 была подтверждена методом $TCID_{50}$; титры составили 9,45, 8,95, 9,95 и 8,45 $\log_{10} TCID_{50}/мл$ для hPIV1, hPIV2, hPIV3 и hPIV4 соответственно.

Антигенная характеристика типовых изолятов hPIV1–3 в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) показала наличие гомологичных титров антигемагглютинирующих антител в диапазоне 1:80–1:640. Наиболее высокие гомологичные титры были зарегистрированы для hPIV3, далее следовали hPIV1 и hPIV2. Для hPIV4, вследствие отсутствия гемагглютинирующей активности в условиях эксперимента, активность специфической антисыворотки была оценена в реакции нейтрализации на клетках MA-104; крысиная антисыворотка подавляла развитие цитопатического действия гомологичного вируса до разведения 1:320.

Все полученные изоляты hPIV были депонированы в коллекцию вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Типовые штаммы hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023, hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023 и hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023, а также соответствующие крысиные поликлональные антисыворотки были депонированы в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

2.3.Разработка и валидация панелей праймеров для полногеномной амплификации hPIV1–3

Одним из ключевых результатов исследования стала разработка панелей праймеров для полногеномной амплификации вирусов парагриппа человека типов 1–3. Дизайн панелей основывался на анализе полных геномных последовательностей, доступных в базе данных GenBank, что позволило подобрать праймеры к наиболее консервативным участкам вирусных геномов. Разработанные панели обеспечивали получение перекрывающихся ампликонов длиной

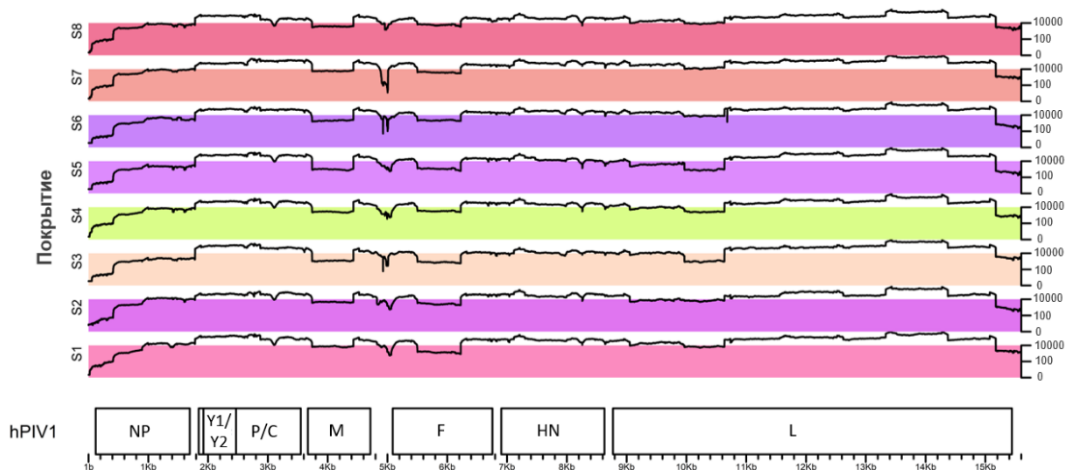
около 1 тыс. п.н. с перекрытием приблизительно 200 п.н., обеспечивая реконструкцию практически полных геномных последовательностей вирусов.

Апробация панелей на клинических образцах продемонстрировала их высокую эффективность. Для большинства исследованных образцов доля прочтений, картированных на референсные геномы, составляла около 95%, а покрытие генома при глубине секвенирования $\geq 20\times$ превышало 90%. Полученные данные характеризовались равномерным распределением покрытия по всей длине генома и минимальным количеством участков с отсутствием прочтений (Рисунок 2).

Оценка аналитической специфичности показала, что разработанные панели обеспечивают амплификацию исключительно соответствующих типов hPIV и не демонстрируют перекрёстной реактивности с другими респираторными вирусами, включая вирусы гриппа А и В, риновирусы, респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы человека, метапневмовирусы и аденовирусы.

При оценке аналитической чувствительности установлено, что покрытие более 90% длины генома при глубине $\geq 20\times$ достигалось при значениях $Ct \leq 34$ для hPIV1, $Ct \leq 23$ для hPIV2 и $Ct \leq 32$ для hPIV3. Тестирование панелей на филогенетически удалённых референсных штаммах C35, Greer и C243 подтвердило их робастность и способность эффективно амплифицировать генетически разнообразные варианты вирусов парагриппа человека.

С использованием разработанных панелей были получены полные геномные последовательности 105 штаммов hPIV1, 37 штаммов hPIV2 и 303 штаммов hPIV3, циркулировавших в Санкт-Петербурге в период 2017–2025 гг. Полученные данные представляют собой первый крупный массив полногеномных последовательностей hPIV1–3 российского происхождения, депонированных в международных базах данных, и могут быть использованы в программах геномного эпидемиологического надзора за респираторными вирусами.



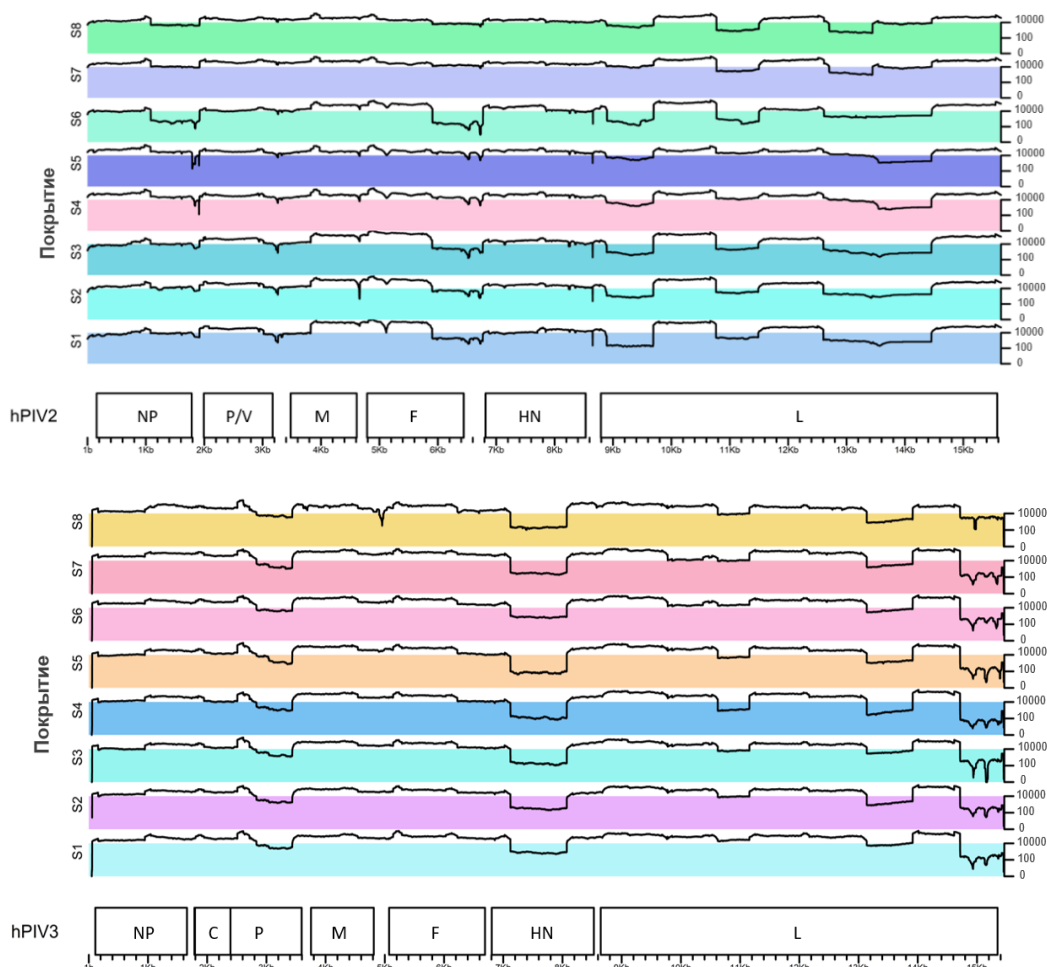


Рисунок 2. Графики покрытия геномов hPIV1-3, созданные с помощью скрипта VizCoV в среде RStudio (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>). Обозначение «S» соответствует отдельным образцам (Sample). Глубина покрытия представлена в логарифмическом масштабе ($\log_{10}$), что позволяет визуализировать диапазон значений покрытия по всему геному. Внизу представлена схема генома hPIV типов 1-3.

2.4. Амплификация генома hPIV4 методом SMART-9N

В отличие от hPIV1–3, для получения полных геномных последовательностей hPIV4 был использован метагеномный подход SMART-9N. Выбор данного метода был обусловлен выраженной генетической гетерогенностью hPIV4, представленного двумя подтипами (hPIV4a и hPIV4b), при отсутствии предварительной информации о принадлежности исследуемых образцов к конкретному подтипу. В этих условиях применение указанного подхода амплификации представлялось наиболее целесообразным.

С использованием технологии SMART-9N были успешно получены полные геномные последовательности всех восьми исследованных изолятов hPIV4 (Рисунок 3). Анализ покрытия продемонстрировал его равномерное распределение по всей длине вирусного генома, включая как

структурные, так и неструктурные гены, без протяжённых участков с отсутствием прочтений. Более 90 % позиций генома были покрыты с глубиной $\geq 20\times$, при этом позиции с нулевым покрытием отсутствовали. Полученные результаты свидетельствуют о том, что технология SMART-9N обеспечивает надёжное восстановление полных геномов hPIV4 и может эффективно применяться для молекулярно-генетических и филогенетических исследований данного типа вируса.

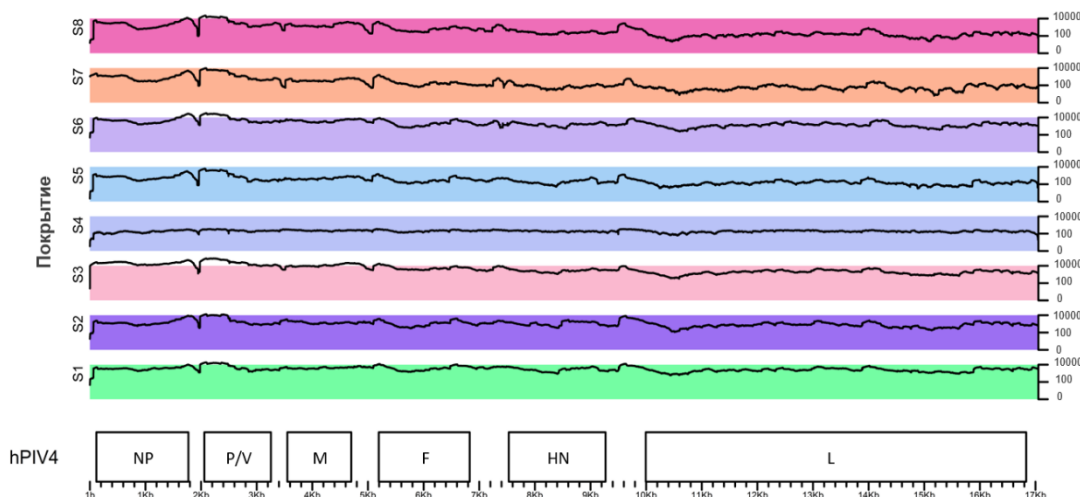


Рисунок 3. Графики покрытия геномов hPIV4, созданные с помощью скрипта VizCoV в среде RStudio (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>). Обозначения как на рис.2.

2.5. Сравнение последовательностей геномов, полученных непосредственно из клинических образцов и из культивированных изолятов

Для оценки возможного возникновения адаптационных изменений при культивировании вируса было проведено сравнение полногеномных последовательностей, полученных из исходных клинических образцов и соответствующих культивированных изолятов после второго пассажа в клеточной культуре. Анализ включал 36 пар «клинический образец – изолят», в том числе 20 пар hPIV1, 7 пар hPIV2 и 9 пар hPIV3. Для hPIV4 подобное сравнение не проводилось, поскольку секвенированию подвергались только культивированные изоляты.

Показано, что культивированные изоляты сохраняли высокую степень генетического сходства с соответствующими клиническими образцами. Общее число выявленных нуклеотидных различий было ограниченным и составляло от 1 до 6 замен на геном, при этом большинство из них являлись синонимичными. Несинонимичные аминокислотные замены выявлялись лишь в части исследованных пар и затрагивали преимущественно белки P, HN и L у hPIV1, белки M и L у hPIV2, а также белки P, HN и L у hPIV3. При этом повторяющихся изменений, общих для независимых изолятов одного типа hPIV, обнаружено не было.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженных адаптивных мутаций вирусов парагриппа человека при краткосрочном пассировании в клеточных культурах МА-104 и

LLC-MK2 и подтверждают возможность использования культивированных изолятов для последующих молекулярно-генетических и филогенетических исследований.

2.6. Полногеномный филогенетический анализ вирусов парагриппа человека

Полногеномный филогенетический анализ был проведён для всех четырёх типов вируса парагриппа человека с использованием полученных в настоящем исследовании российских последовательностей и референсных геномов, представленных в базе данных GenBank. Интерпретация филогенетических деревьев проводилась в контексте ранее описанных филогенетических групп hPIV с учётом топологии дерева, значений бутстреп-поддержки и средних попарных генетических расстояний. Такой подход позволил охарактеризовать положение российских штаммов среди глобально циркулирующих вариантов hPIV1–4.

2.6.1. Филогенетический анализ вирусов hPIV1

Полногеномный филогенетический анализ hPIV1 показал, что популяция этого типа подразделяется на четыре основных клайда, обозначенных A–D. Клайд A представлен ограниченным числом исторических штаммов из США и отражает раннюю эволюционную ветвь вируса. Клайды B, C и D включают современные циркулирующие варианты hPIV1 и характеризуются дальнейшей генетической диверсификацией.

Большинство российских штаммов относилось к клайду C, представляющему наиболее многочисленную и генетически разнообразную группу современных hPIV1. В пределах данного клайда были выделены две генетические линии (C1 и C2), при этом основная часть российских последовательностей группировалась в линии C2. Российские штаммы также выявлялись в клайдах B и D. В клайде D возможно выделить две линии: линию D2, включающую пять российских штаммов, выявленных в 2023 г., и линию D1, представленную исключительно штаммами из Китая.

Российские последовательности формировали филогенетические группы совместно со штаммами из США, Китая, Японии, Франции, Аргентины и других стран, не образуя самостоятельных географически обособленных кластеров. Это свидетельствует о том, что российские вирусы hPIV1 являются частью глобально циркулирующей популяции и не формируют отдельных региональных вариантов. Одновременное выявление российских штаммов в нескольких филогенетических группах также указывает на коциркуляцию генетически различных вариантов hPIV1 в Санкт-Петербурге в течение периода наблюдения.

Полученные результаты в целом согласуются с данными предыдущих исследований, основанных на анализе гена HN. Для основных клайдов и генетических линий hPIV1 были определены характерные аминокислотные замены, наиболее часто затрагивавшие белки P, HN и L, что дополнительно подтверждает устойчивость выявленной филогенетической структуры.

2.6.2. Филогенетический анализ вирусов hPIV2

Полногеномный филогенетический анализ hPIV2 выявил два основных кластера, обозначенных A и B. Кластер A подразделялся на три подкластера (A1–A3), тогда как наиболее многочисленный кластер B включал два подкластера (B1 и B2). В пределах подкластера B2

выделялись две генетические линии, B2a и B2b, отражающие дальнейшую диверсификацию современных вариантов hPIV2.

Большинство российских штаммов относилось к кластеру В и распределялось между линиями B2a и B2b. При этом основная часть российских последовательностей была отнесена к линии B2a, тогда как меньшая часть группировалась в пределах линии B2b. Кроме того, отдельные российские штаммы были выявлены в подкластерах A2 и A3, что свидетельствует о коциркуляции нескольких генетически различающихся вариантов hPIV2 в исследуемый период. Российские штаммы формировали филогенетические группы совместно со штаммами из США, Китая, Хорватии, Нидерландов, Японии и Аргентины, не образуя самостоятельных географически обособленных кластеров. Это указывает на отсутствие выраженной географической изоляции российских вирусов и отражает их принадлежность к глобально циркулирующей популяции hPIV2.

Полученные результаты в целом согласуются с данными предыдущих исследований, основанных на анализе отдельных геномных регионов. Для основных кластеров, подкластеров и генетических линий hPIV2 были определены характерные аминокислотные замены, наиболее выраженные в белках Р, HN и L, что дополнительно подтверждает устойчивость выявленной филогенетической структуры.

2.6.3. Филогенетический анализ вирусов hPIV3

Полногеномный филогенетический анализ hPIV3 подтвердил существование ранее описанных кластеров А, В и С, а также позволил выявить дополнительную генетическую группу, обозначенную как кластер D. Кластер С сохранял доминирующее положение среди современных вариантов hPIV3 и характеризовался наиболее сложной внутренней структурой, подразделяясь на подкластеры C1, C2, C3 и C5. В соответствии с ранее опубликованной номенклатурой внутри подкластера C3 были выделены генетические линии C3a, C3b, C3c, C3e и C3f.

Большинство российских штаммов относилось к кластеру С и распределялось преимущественно между подкластером C3 и подкластером C5. Наиболее широко среди российских последовательностей была представлена линия C3a, ранее описанная как одна из доминирующих современных линий hPIV3. Отдельные российские штаммы также выявлялись в линиях C1c, C2, C3b и C3e, что свидетельствует об одновременной циркуляции нескольких генетически различающихся вариантов hPIV3 в Санкт-Петербурге в течение исследуемого периода. При этом российские последовательности не формировали самостоятельных географически обособленных групп, а объединялись со штаммами из США, Китая, Японии, Франции, Аргентины, Южной Африки и других стран, отражая глобальный характер распространения современных линий hPIV3.

Одним из наиболее значимых результатов исследования стало выявление ранее неописанной филогенетической группы hPIV3, обозначенной как кластер D. Данный кластер включал семь российских штаммов, а также последовательности из Франции, Германии, Пакистана, Сингапура, Малайзии и США. Кластер D формировал самостоятельную устойчивую монофилетическую ветвь с высокой бутстреп-поддержкой и характеризовался уровнем генетической дивергенции, соответствующим критериям выделения отдельных кластеров hPIV3. Дополнительным аргументом в пользу его филогенетической обособленности служило наличие большого числа

групп-специфических аминокислотных замен, распределённых по нескольким вирусным белкам. Наиболее выраженные различия выявлялись в белках Р и L, тогда как дополнительные характерные замены определялись в поверхностных гликопротеинах HN и F.

Полученные результаты не только подтверждают ранее описанную структуру популяции hPIV3, но и указывают на продолжающуюся диверсификацию данного вируса.

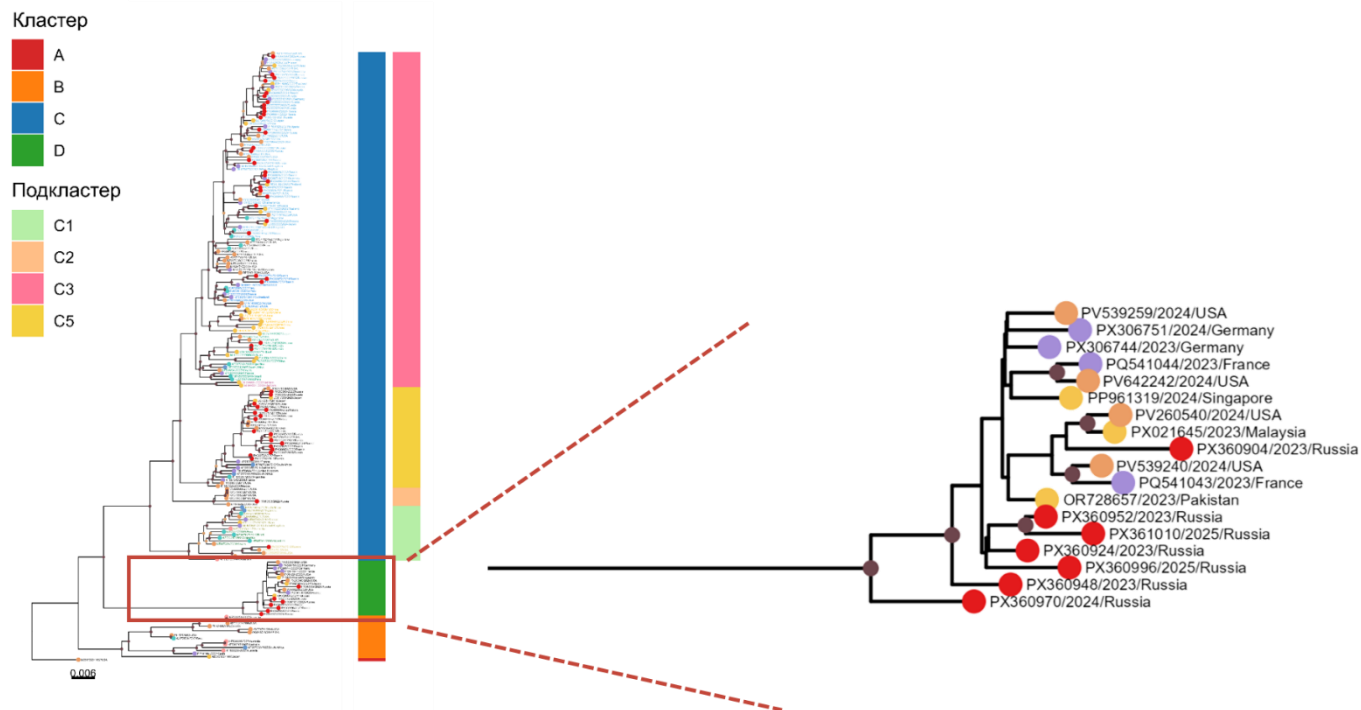


Рисунок 4. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия построено на основе 200 репрезентативных полногеномных последовательностей hPIV3 с выделением новоохарактеризованного кластера D (выделен красной рамкой). Выноска показывает детальную структуру кластера D.

2.6.4. Филогенетический анализ вирусов hPIV4

Филогенетический анализ hPIV4 подтвердил чёткое разделение вирусов на два подтипа — hPIV4a и hPIV4b. Внутри hPIV4a были выделены три основных кластера (A–C), при этом наиболее многочисленный кластер C подразделялся на подкластеры C1–C3. В свою очередь, hPIV4b включал два основных кластера (A и B), причём кластер B демонстрировал дальнейшую диверсификацию на уровне подкластеров.

Все российские изоляты hPIV4 относились к подтипу hPIV4a и распределялись внутри подкластера C3, представляющего наиболее широко распространённую современную группу hPIV4a. Российские последовательности формировали филогенетические группы совместно со штаммами из США, Японии, Тайваня и Индии, что свидетельствует об отсутствии выраженной

географической кластеризации и указывает на принадлежность российских вирусов к глобально циркулирующей популяции hPIV4a.

Для hPIV4a и hPIV4b были определены характерные аминокислотные замены, специфичные для отдельных филогенетических групп. Наиболее выраженные различия внутри hPIV4a наблюдались в белках HN и L, тогда как для hPIV4b наибольшее число групп-специфических аминокислотных маркеров выявлялось в белках P, HN, F и L.

Филогенетические деревья, отражающие общую структуру генетического разнообразия hPIV1–4, представлены на рисунке 5.

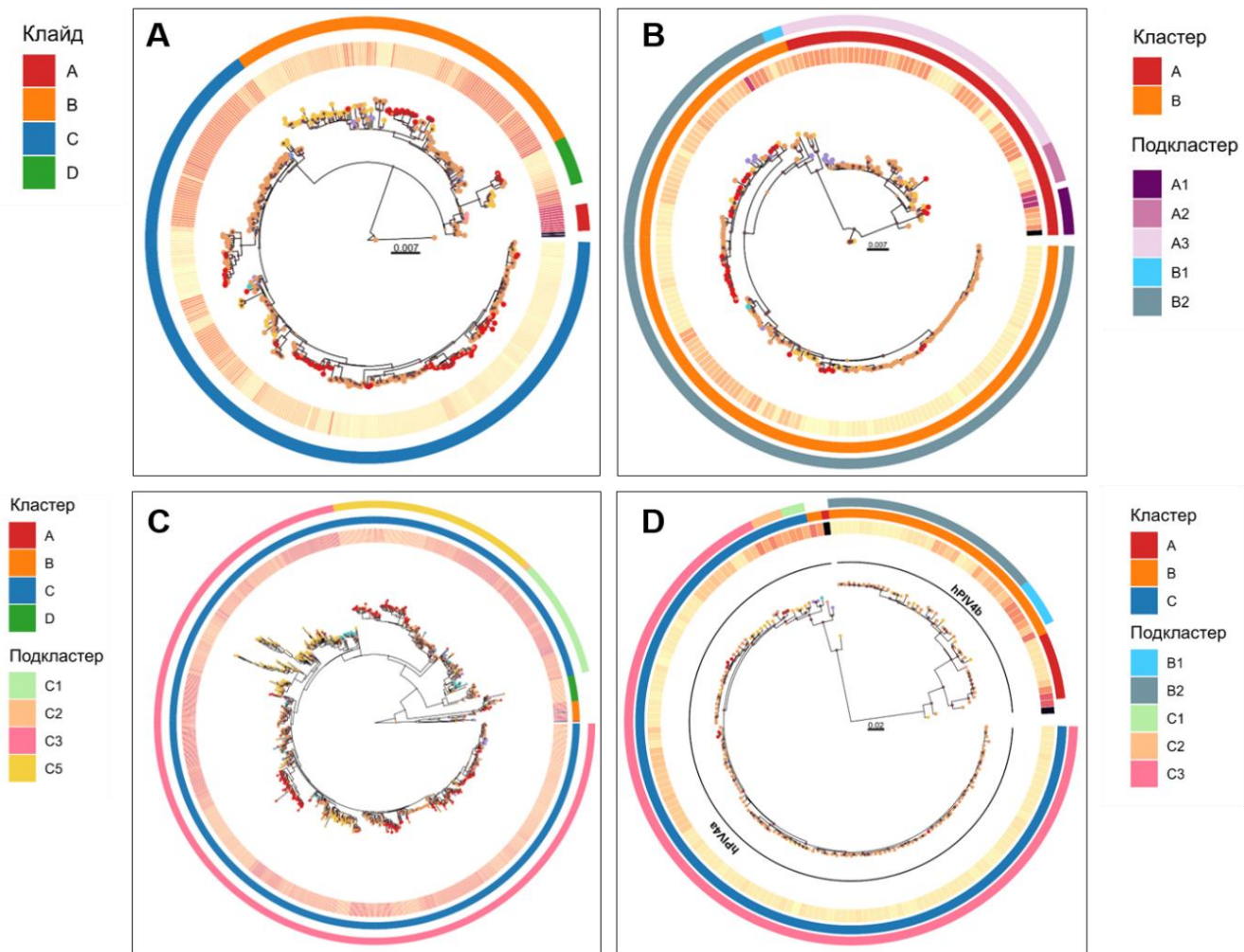


Рисунок 5. Филогенетические деревья полных геномов четырех типов вируса парагриппа человека (hPIV1–4). Круговые филогенетические деревья максимального правдоподобия построены на основе полногеномных последовательностей для всех четырех типов hPIV: (A) hPIV1, (B) hPIV2, (C) hPIV3 и (D) hPIV4. Деревья демонстрируют генетическое разнообразие каждого типа в глобальном масштабе.

2.7. Филогенетический анализ на основе гена HN и аминокислотные вариации

Дополнительный филогенетический анализ на основе полной кодирующей последовательности гена HN был проведён для всех четырёх типов вируса парагриппа человека. Полученные филогенетические деревья в целом воспроизводили топологию, выявленную при полногеномном анализе, включая основные клайды, кластеры, подкластеры и генетические линии, что подтверждает высокую информативность гена HN для молекулярно-эпидемических исследований hPIV.

Для hPIV1 филогенетический анализ гена HN подтвердил разделение вирусов на четыре основных клайда (A–D) и соответствующие генетические линии, выявленные при анализе полных геномов. Несмотря на незначительные различия в положении отдельных ветвей, общий состав и структура филогенетических групп оставались неизменными. Для hPIV2 филогения, основанная на гене HN, воспроизводила разделение вирусов на два основных кластера (A и B), а также дальнейшую дифференциацию на подкластеры и генетические линии. Распределение российских штаммов соответствовало результатам полногеномного анализа. Для hPIV3 анализ гена HN подтвердил ранее установленную структуру популяции вируса, включая кластеры A–C и организацию подкластеров внутри кластера C. Важно отметить, что вновь выявленный при полногеномном анализе кластер D также формировал самостоятельную хорошо поддерживаемую монофилетическую группу в филогенетическом дереве, построенном на основе гена HN, что независимо подтверждает существование данной генетической группы. Для hPIV4 филогенетический анализ гена HN воспроизводил разделение вирусов на подтипы hPIV4a и hPIV4b, а также выявленную при полногеномном анализе кластерную структуру внутри каждого подтипа. Все российские изоляты сохраняли своё положение в пределах подтипа hPIV4a.

Реконструкция предковых состояний позволила проследить возникновение аминокислотных замен в белке HN вдоль ветвей филогенетических деревьев и выявить молекулярные маркеры, специфичные для отдельных филогенетических групп. Наиболее выраженные различия наблюдались между основными кластерами и клайдами, тогда как дополнительные замены характеризовали отдельные подкластеры и генетические линии. Полученные результаты свидетельствуют о согласованности данных полногеномного анализа и филогении гена HN и позволяют выделить дополнительные молекулярные признаки, отражающие генетическую диверсификацию вирусов парагриппа человека.

2.8. Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования белка HN

Поскольку белок HN является поверхностным вирусным гликопротеином, играющим важную роль в прикреплении вируса к клеточным рецепторам и проникновении вируса в клетку, был проведён анализ потенциальных N-связанных сайтов гликозилирования в аминокислотных последовательностях HN для всех четырёх типов вируса парагриппа человека.

Для hPIV1 было выявлено восемь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования, большинство из которых были высококонсервативными среди анализируемых последовательностей. Небольшая вариабельность наблюдалась в позициях 77 и 511, где у части штаммов отмечалась утрата или появление предсказанного гликозилирования.

Для hPIV2 также был установлен относительно консервативный набор потенциальных сайтов гликозилирования. В отдельных российских штаммах наблюдалось появление дополнительных мотивов вследствие аминокислотных замен, формирующих каноническую последовательность N-X-S/T. Особый интерес представляет потенциальный сайт гликозилирования в позиции 316, расположенный вблизи ранее описанного антигенного участка белка HN. Согласно опубликованным данным, наличие или отсутствие гликозилирования в подобных позициях может влиять на пространственную доступность отдельных антигенных детерминант.

Для hPIV3 было выявлено три основных потенциальных сайта гликозилирования, которые в большинстве случаев сохранялись среди анализируемых последовательностей. В штаммах, принадлежащих к вновь выявленному кластеру D, наблюдались особенности гликозилирования, включая утрату одного из предсказанных сайтов и появление дополнительного потенциального мотива у некоторых штаммов. Эти различия отражают генетическую диверсификацию данной группы вирусов.

Для hPIV4 были выявлены различия в профиле гликозилирования между подтипами hPIV4a и hPIV4b. У подтипа hPIV4a было предсказано шесть потенциальных сайтов гликозилирования, тогда как у подтипа hPIV4b один из них отсутствовал, что указывает на подтип-специфические различия в структуре белка HN.

Следует отметить, что N-связанное гликозилирование вирусных гликопротеинов может влиять на пространственную структуру белка, стабильность, а также взаимодействие с иммунной системой хозяина. Однако анализ показал, что основные каталитические и функционально важные участки белка HN оставались консервативными, а выявленные различия в гликозилировании не затрагивали известные ключевые функциональные домены белка. Функциональное значение выявленных вариаций в потенциальных сайтах N-связанного гликозилирования в рамках настоящего исследования не анализировалось.

2.9. Анализ рекомбинации

Дополнительно был проведён анализ потенциальных событий рекомбинации на основе полных геномных последовательностей hPIV1–4. Установлено, что для hPIV1 и hPIV4 статистически подтверждённых событий рекомбинации не происходило. Выявлен один потенциальный рекомбинантный штамм hPIV2 подкластера A2 с точкой рекомбинации, локализованной между позициями нуклеотидов 13,586–14,528 (участок генома, кодирующий белок L), а также два рекомбинантных штамма hPIV3, оба принадлежавшие вновь охарактеризованному кластеру D. В обоих штаммах hPIV3 событие рекомбинации охватило область генома между позициями нуклеотидов, кодирующих белок HN. При этом выявленные рекомбинантные штаммы сохраняли принадлежность к соответствующим филогенетическим группам и не оказывали существенного влияния на общую структуру полногеномных филогенетических деревьев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой первое в России комплексное молекулярно-генетическое исследование вирусов парагриппа человека, выполненное на основе полногеномного секвенирования. В ходе исследования был сформирован и проанализирован масштабный массив полных геномных последовательностей hPIV1–4, циркулировавших в Санкт-Петербурге в течение восьми эпидемических сезонов, что позволило существенно расширить современные представления о генетическом разнообразии данных вирусов и впервые охарактеризовать их популяционную структуру в России в глобальном филогенетическом контексте. Разработанные и валидированные панели праймеров для полногеномной амплификации hPIV1–3, защищённые патентами Российской Федерации, продемонстрировали высокую эффективность при работе непосредственно с клиническим материалом, тогда как применение метагеномного подхода SMART-9N обеспечило получение полных геномов hPIV4 и позволило включить данный тип в общий сравнительный анализ.

Проведённый полногеномный филогенетический анализ показал, что вирусы парагриппа человека, циркулирующие в Санкт-Петербурге, характеризуются значительным внутритипным генетическим разнообразием и относятся к глобально распространённым филогенетическим группам. Особую значимость представляет выявление ранее неопisanного кластера D вируса hPIV3, что подчёркивает высокую разрешающую способность полногеномного подхода и его значение для обнаружения новых генетических вариантов вирусов. Дополнительный анализ гена HN, аминокислотных замен и потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования подтвердил согласованность молекулярных и филогенетических данных и показал, что, несмотря на наличие групп-специфичных молекулярных особенностей, ключевые функционально значимые области белка HN сохраняют высокую степень консервативности.

Таким образом, результаты исследования имеют существенное теоретическое и практическое значение, расширяют современные представления об эволюции и генетическом разнообразии вирусов парагриппа человека и формируют научную основу для дальнейших молекулярно-эпидемиологических исследований. Полученные геномные данные, разработанные методические подходы и сформированная коллекция вирусных изолятов могут быть использованы для совершенствования системы геномного мониторинга респираторных вирусов в Российской Федерации.

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации

Целесообразно продолжить молекулярный надзор за hPIV на расширенных выборках для интеграции получаемых геномных данных с клинико-эпидемиологической информацией. Сформированная коллекция изолятов hPIV1-4 и антисывороток к ним послужит основой для дальнейших исследований по расширенной характеристике антигенных свойств вирусов парагриппа человека и их взаимосвязи с генетической изменчивостью гликопротеинов. Предложенные методологические подходы могут быть внедрены в систему геномного мониторинга вирусов парагриппа человека и других патогенов-возбудителей ОРВИ.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы биологические свойства полученной коллекции современных изолятов четырёх типов вирусов парагриппа человека; краткосрочное пассирование вирусов парагриппа в клеточных культурах LLC-MK2 и MA-104 не приводит к появлению адаптационных мутаций как в генах, кодирующих поверхностные гликопротеины вируса, так и во внутренних генах вирусов парагриппа.
2. Панели праймеров для полногеномной амплификации вирусов парагриппа человека типов hPIV1, hPIV2 и hPIV3 обеспечивают получение полных геномных последовательностей вируса непосредственно из клинического материала.
3. На основе полученных 453 полногеномных последовательностей hPIV1–4 охарактеризована популяционная структура вирусов парагриппа, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Показано, что в регионе одновременно циркулируют множественные генетические линии в рамках типов (hPIV1: клэйды В, С и D; hPIV2: кластеры А и В; hPIV3: кластеры С и D; hPIV4a: кластер С), распространенные в глобальном масштабе. Для всех типов идентифицированы и охарактеризованы группы-специфические аминокислотные замены в поверхностном гликопротеине HN, подтверждающие топологию полногеномных деревьев.
4. Для вирусов hPIV3 выявлен и филогенетически обоснован ранее неописанный филогенетический кластер D, характеризующийся значительной генетической дивергенцией и наличием групп-специфических аминокислотных замен.
5. Для всех четырёх типов hPIV были выявлены консервативные аминокислотные маркеры, характерные для отдельных филогенетических групп и сохраняющиеся у всех входящих в них вирусов; наибольшее число групп-специфичных аминокислотных замен выявлялось в генах HN, Р и L. Подтверждено, что рекомбинация является редким событием: потенциальные события рекомбинации выявлены для одного штамма hPIV2 и двух штаммов hPIV3, тогда как среди проанализированных последовательностей hPIV1 и hPIV4 признаков рекомбинации обнаружено не было.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, или входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных

1. Mansour, O., Fadeev, A. V., Perederiy, A. A., Danilenko, D. M., Lioznov, D. A., & Komissarov, A. B. Development of Primer Panels for Amplicon Sequencing of Human Parainfluenza Viruses Type 1 and 2 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – V. 25. – P.13119. <https://doi.org/10.3390/ijms252313119>. (Q1).
2. Mansour, O., Fadeev, A. V., Perederiy, A. A., Zadirienko, M. I., Danilenko, D. M., Lioznov, D. A., & Komissarov, A. B. Genetic Diversity and Molecular Analysis of Human Parainfluenza Virus Type 3 in Saint Petersburg (Russia) in 2017-2023: Emergence of a New Phylogenetic Cluster // *Viruses.* – 2025. – V. 17. – P. 1197. <https://doi.org/10.3390/v17091197> (Q1).
3. Chen, J., Deng, S., Xu, X., Chen, S., Abo, Y. N., Bassat, Q., Deng, J., Komissarov, A. B., Liu, E., Muñoz-Almagro, C., Ren, L., Stolyarov, K., Tomlinson, J., Cai, Z., Qiao, M., Li, Y., Wang, X., & Respiratory Virus Global Epidemiology Network; Mansour, O. (2025). Regional and type-specific variations in the global seasonality of human parainfluenza viruses and the influence of climatic

factors: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Global Health, 13(8), e1425–e1435. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(25\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(25)00188-3) (Q1).

4. Mansour, O., Fadeev, A. V., Perederiy, A. A., Ksenafontov, A. D., Danilenko, D. M., Lioznov, D. A., & Komissarov, A. B. Phylogenetic analysis of the full-length genome sequence of clinical isolates of human parainfluenza virus 4 //Viruses. – 2026, – V.18 – P.497 –<https://doi.org/10.3390/v18050497> (Q1).

Патенты

1. Мансур У. Панель праймеров для полногеномного секвенирования вирусов парагриппа человека 1 и 2 типа: пат. № 2833687. Российская Федерация / У. Мансур, А. Б. Комиссаров, А. В. Фадеев [и др.]; заявитель: ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. заявл. 17.07.2024; опубл. 28.01.2025.
2. Мансур У. Набор для полногеномной амплификации вируса парагриппа 3-го типа для секвенирования нового поколения: пат. № 2859039. Российская Федерация / У. Мансур, А. Б. Комиссаров, А. В. Фадеев [и др.]; заявитель: ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. заявл. 13.10.2025; опубл. 26.03.2026.

Список штаммов парагриппа депонированных в Государственную коллекцию вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

1. Штамм hPiv1/Russia/SPE-R11-18746V/2023. Номер ГКВ: 3039. Авторы штамма: **Мансур Ула**, Бояринцева А.Ю., Петрова П.А., Замниус А.В., Комиссаров А.В., Даниленко Д.М. Депонирован 23 апреля 2024 г.
2. Штамм hPiv2/Russia/SPE-R11-17155V/2023. Номер ГКВ: 3040. Авторы штамма: **Мансур Ула**, Бояринцева А.Ю., Петрова П.А., Замниус А.В., Комиссаров А.В., Даниленко Д.М. Депонирован 23 апреля 2024 г.
3. Штамм hPiv3/Russia/SPE-R11-15457V/2023. Номер ГКВ: 3041. Авторы штамма: **Мансур Ула**, Бояринцева А.Ю., Петрова П.А., Замниус А.В., Комиссаров А.В., Даниленко Д.М. Депонирован 23 апреля 2024 г.
4. Штамм hPiv4/Russia/SPE-R11-1446V1/2023. Номер ГКВ: 3083. Авторы штамма: **Мансур Ула**, Бояринцева А.Ю., Петрова П.А., Замниус А.В., Комиссаров А.В., Даниленко Д.М. Депонирован 12 ноября 2025 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции

hPIV – вирус парагриппа человека

NN – гемагглютинин-нейраминидаза

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ЦПД – цитопатическое действие

РГА – реакция гемагглютинации

РТГА – реакции торможения гемагглютинации

NGS – секвенирования нового поколения

SMART – (Switching Mechanism at the 5' End of RNA Template) - механизм переключения на 5'-конце РНК-матрицы

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю, кандидату биологических наук Даниленко Дарье Михайловне, за неоценимый вклад в выполнение настоящего исследования, постоянное внимание, профессиональную поддержку, ценные научные рекомендации и неизменную веру в успешное завершение работы на всех этапах её выполнения.

Особую признательность автор выражает заведующему лабораторией молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Комиссарову Андрею Борисовичу за создание благоприятных условий для проведения исследования, всестороннюю поддержку, научные консультации на протяжении всего периода подготовки диссертации и за помощь при подготовке, обсуждении и критическом анализе научных публикаций.

Автор выражает искреннюю благодарность Передерию Александру Александровичу за практическую помощь в подготовке и визуализации филогенетических деревьев и других иллюстративных материалов, а также за неизменную готовность оказать поддержку и содействие на различных этапах выполнения исследования и подготовки научных публикаций.

Автор признателен Фадееву Артёму Викторовичу за ценные консультации, конструктивные обсуждения и постоянную готовность оказать помощь при проведении биоинформатического анализа и интерпретации полученных данных.

Автор искренне благодарит сотрудников лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России за неоценимую практическую помощь при проведении экспериментов по выделению вирусов парагриппа человека, поддержку в работе с клеточными культурами, а также за готовность делиться опытом и оказывать содействие на всех этапах выполнения данной части исследования.

Особые слова признательности автор адресует коллективу лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России за доброжелательную атмосферу, взаимопомощь, поддержку и участие, которые сопровождали автора на протяжении выполнения настоящего исследования и подготовки диссертации.

Автор также выражает благодарность всем коллегам и соавторам, чьи советы, обсуждения и содействие способствовали успешному выполнению данной работы.