



УДК 578.72

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108725>

МАРКЕРЫ АТТЕНУАЦИИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

А.В. Грачева¹, Е.Р. Корчевая¹, Р.В. Самойликов¹, Д.И. Смирнова¹, И.А. Ленева¹, А.А. Поромов¹,
А.А. Панкратов², Г.В. Трунова², В.А. Хохлова², Ф.Г. Нагиева¹, О.А. Свитич¹, В.В. Зверев¹, Е.Б. Файзулов^{1, 3}

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, Москва, Россия;

³ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Для цитирования: 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: <https://doi.org/10.17816/MAJ108725>

Рукопись получена: 02.06.2022

Рукопись одобрена: 15.06.2022

Опубликована: 30.06.2022

Обоснование. Беспрецедентные противоэпидемические мероприятия и широкое применение вакцин против COVID-19 позволили снизить уровень госпитализации и смертности от заболевания, но не остановили пандемическое распространение коронавируса SARS-CoV-2. Именно поэтому актуальна разработка живых вакцин против COVID-19, способных обеспечить формирование длительного гуморального и клеточного иммунного ответа и перекрестную защиту от новых эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2. Ранее в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова были получены холодоадаптированные (*ca*, cold-adapted) варианты коронавируса SARS-CoV-2.

Цель настоящей статьи — поиск методических подходов, позволяющих производить скрининговые исследования *in vitro* для оценки аттенуационного (*att*) фенотипа *ca* вариантов SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka и его варианты культивировали в клетках Vero и Calu-3. Количественное определение вируса проводили путем титрования в клетках Vero и методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. *Att*-фенотип вариантов SARS-CoV-2 определяли на животной модели COVID-19 на сирийских хомяках.

Результаты. В опытах на сирийских хомяках установлено наличие у *ca*-вариантов вируса *att*-фенотипа. Животные, зараженные *ca*-вариантами вируса, достоверно меньше теряли в весе, имели меньшую вирусную нагрузку в легких и мозге и менее выраженные патологические изменения в легких по сравнению с заражением вирулентным штаммом. В экспериментах *in vitro* на клетках Vero и Calu-3 выявлены вероятные маркеры аттенуации *ca*-вариантов вируса для сирийских хомяков: (1) способность размножаться при пониженной температуре (*ca*-фенотип); (2) неспособность размножаться при 39 °C (*ts*-фенотип); (3) изменение видовой и тканевой специфичности вируса.

Заключение. Разработанные методические подходы к выявлению *in vitro* маркеров аттенуации SARS-CoV-2 — ценный инструмент контроля стабильности фенотипа кандидатных вакцинных штаммов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; холодоадаптированный вирус; маркеры аттенуации; живая вакцина.

ATTENUATION MARKERS OF COLD-ADAPTED SARS-COV-2 VARIANTS

Anastasiya V. Gracheva¹, Ekaterina R. Korchevaya¹, Roman V. Samoilkov¹, Daria I. Smirnova¹,
Irina A. Leneva¹, Artem A. Poromov¹, Andrey A. Pankratov², Galina V. Trunova², Varvara A. Khokhlova²,
Firaya G. Nagieva¹, Oksana A. Svitich¹, Vitaly V. Zverev¹, Evgeny B. Fayzuloev^{1, 3}

¹ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

² National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russia;

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

For citation: Gracheva AV, Korchevaya ER, Samoilkov RV, Smirnova DI, Leneva IA, Poromov AA, Pankratov AA, Trunova GV, Khokhlova VA, Nagieva FG, Svitich OA, Zverev VV, Fayzuloev EB. Attenuation markers of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Medical Academic Journal*. 2022;22(2):79–88. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108725>

Received: 02.06.2022

Accepted: 15.06.2022

Published: 30.06.2022

Список сокращений

MOI — множественность заражения; п. и. — после инфицирования; ОТ–ПЦР–РВ — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени; РНК — рибонуклеиновая кислота; ТЦД₅₀ — 50 % тканевая цитопатическая доза.

BACKGROUND: Unprecedented anti-epidemic measures and the widespread use of vaccines against COVID-19 have reduced the rate of hospitalization and mortality from the disease, but have not stopped the SARS-CoV-2 pandemic spread. The development of live vaccines against COVID-19, capable of providing the formation of a long-term humoral and cellular immune response and cross-protection against new SARS-CoV-2 variants of concern, is relevant. Previously at the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera SARS-CoV-2 cold-adapted (*ca*, cold-adapted) variants were obtained. This work is aimed to search for methodological approaches that allow *in vitro* screening studies to assess the attenuation (*att*) phenotype of *ca* SARS-CoV-2 variants.

MATERIALS AND METHODS: The SARS-CoV-2 laboratory strain Dubrovka and its variants were cultured in Vero and Calu-3 cells. Quantitation of the virus was carried out by titration in Vero cells and by real-time RT-PCR. The attenuation (*att*) phenotype of SARS-CoV-2 variants was determined on an animal model of COVID-19 on Syrian hamsters.

RESULTS: In experiments on Syrian hamsters, the presence of the *att* phenotype in the *ca* variants of the virus was established. Animals infected with virus *ca* variants had significantly less weight lost, had less viral load in the lungs and brain and less pronounced pathological changes in the lungs compared to infection with the virulent strain. *In vitro* experiments on Vero and Calu-3 cells revealed probable attenuation markers of the virus *ca* variants for syrian hamsters: (1) ability to reproduce at low temperature (*ca* phenotype); (2) inability to reproduce at 39 °C (*ts* phenotype); (3) changes in the species and tissue specificity of the virus.

CONCLUSIONS: The developed methodological approaches to the identification of SARS-CoV-2 attenuation markers are a valuable tool for monitoring the stability of the phenotype of candidate vaccine strains.

Keywords: SARS-CoV-2; cold-adapted virus; attenuation markers; live vaccine.

Обоснование

SARS-CoV-2 — это высокопатогенный коронавирус, который появился в конце 2019 г. и вызвал пандемию острого респираторного заболевания COVID-19, что привело к глобальным социально-экономическим проблемам. Беспрецедентные противоэпидемические мероприятия и широкое применение вакцин против COVID-19 позволили снизить уровень госпитализации и смертности от заболевания, но не остановили пандемическое распространение SARS-CoV-2. Эффективность вакцинопрофилактики снижается в результате появления новых вариантов SARS-CoV-2, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью (Variants of concern, VOC) [1–3], таких как Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). Эти варианты обладают повышенной контагиозностью и плохо нейтрализуются антисыворотками, полученными от реконвалесцентов COVID-19 и вакцинированных лиц [4–7].

В связи с этим актуальны исследования по разработке живой аттенуированной вакцины против COVID-19, способной обеспечить формирование длительного клеточного и гуморального иммунного ответа, а также перекрестную защиту в отношении новых эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2.

Ранее в НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова были получены варианты коронавируса SARS-CoV-2, способные эффективно размножаться при температуре 23 °С, то есть обладающие холодоадаптированным (*ca*, cold-adapted) фенотипом [8].

Цель настоящей статьи — поиск методических подходов, позволяющих производить скрининговые исследования *in vitro* для оценки аттенуационного (*att*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Вирус и культура клеток. В работе использован лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (идент. № GenBank: MW514307.1, классификация по Pangolin B.1.1.317), филогенетически близкий штамму Wuhan-Hu-1 (идент. № GenBank: MN908947.3) [9], и его варианты: Dubrovka-37, Dubrovka-*ca*-B4, Dubrovka-*ca*-D2 (номера GenBank: ON380441.1, ON059701.1 и ON040961.1 соответственно). *Ca*-варианты вируса Dubrovka-*ca*-B4, Dubrovka-*ca*-D2 получены путем длительного пассирования (42 пассажа) штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при постепенно понижаемой до 23 °С температуре с последующим трехкратным клонированием, достигая титра 6,0–7,0 lg 50 % тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀) на мл на 7-е сутки культивирования [8]. Вариант Dubrovka-37, полученный путем длительного пассирования (42 пассажа) штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при температуре 37 °С, при температуре 23 °С не размножался.

Культивирование вируса и экспериментальное заражение проводили на клетках эпителия почки африканской зеленой мартышки Vero CCL81 (American Type Culture Collection, ATCC) (далее клетки Vero) и клетках рака легких человека Calu-3 HTB-55 (ATCC) (далее клетки Calu-3). Клетки культивировали при 37 °С в питательной среде ДМЕМ на основе буфера Эрла (ПанЭко, Россия) с добавлением 5 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), L-глутамин, 300 мкг/мл (ПанЭко), гентамицин, 40 мкг/мл (ПанЭко) в атмосфере 5 % CO₂. Трехдневный монослой клеток Vero или Calu-3 заражали вирусом SARS-CoV-2 при желаемой множественности заражения (MOI), в течение 60 мин проводили адсорбцию вируса, добавляли поддерживающую среду (ростовая среда без 5 % эмбриональной

сыворотки коров) и инкубировали при температуре от 23 до 39 °С в течение 3–8 сут (в зависимости от варианта вируса и цели эксперимента).

Животные. В работе использованы самки золотистых сирийских хомяков ($n = 36$, масса тела 40–50 г) из НПП «Питомник лабораторных животных» Института биоорганической химии РАН.

Титрование вируса SARS-CoV-2 проводили в культуре клеток Vero так, как описано ранее [9], по конечной точке проявления цитопатического действия. Титр вируса рассчитывали по М.А. Ramakrishnan [10] и выражали в \lg ТЦД₅₀/мл.

Идентификацию вируса и количественное определение РНК SARS-CoV-2 в культуральной жидкости и гомогенатах органов проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ–ПЦР–РВ) с вирусоспецифическими праймерами и зондом к гену нуклеокапсида N вируса SARS-CoV-2, как описано ранее [9, 11].

Оценка аттенуационного (*att*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2. Сирийских хомяков (самки, 40 г) заражали интраназально штаммом Dubrovka и *ca*-вариантами вируса в дозе 4,0 \lg ТЦД₅₀/голову. Ежедневно оценивали состояние животных по реакции на звуковые раздражители, активности и взаимодействию в группе, наполненности защечных мешков (оценка аппетита). Каждые 2 дня проводили контроль веса. Через четверо суток после заражения животных гуманно умерщвляли и отбирали легкие и головной мозг для гистологического исследования, определения вирусного титра и концентрации вирусной РНК. Достоверно меньшая потеря в весе, более низкие титр вируса и концентрация вирусной РНК в легких и мозге, менее выраженные патологические изменения в легких животных по сравнению с заражением вирулентным штаммом Dubrovka свидетельствовали о наличии у вируса *att*-фенотипа для сирийских хомяков.

Оценка температурочувствительного (*ts*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2. Клетки Vero заражали *ca*-вариантами SARS-CoV-2 и штаммом Dubrovka при множественности заражения (MOI) 0,001 и инкубировали при температуре 39 °С. Через 3 сут после инфицирования (п. и.) отбирали образцы культуральной жидкости и определяли в них титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Разница в титре вируса или концентрации вирусной РНК по сравнению с заражением штаммом Dubrovka на 4,0 \lg и более свидетельствовала о наличии у вируса *ts*-фенотипа.

Оценка чувствительности клеточных линий к разным вариантам вируса SARS-CoV-2. Клетки Calu-3 и Vero заражали вариантами SARS-CoV-2 и диким штаммом Dubrovka (второй пассаж) при MOI 0,001, инкубировали в поддерживающей среде при температуре 37 °С. Через 3 сут п. и.

отбирали образцы культуральной жидкости и определяли в них концентрацию вирусной РНК. Снижение на 3,0 \lg и более концентрации вирусной РНК в клетках Calu-3 по сравнению с Vero свидетельствовало об изменении видовой и/или тканевой специфичности вируса.

Гистологическое исследование препаратов легких сирийских хомяков проводили в отделении экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена. Правое легкое мышей фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в Гистомикс. На этапе заливки материал ориентировали вдоль длинной оси. Ступенчатые срезы толщиной 3–5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS (Leica, Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты исследовали под световым микроскопом BX 51 (Olympus, Япония) с системой фоторегистрации материала.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета RStudio (версия 1.0.143). Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) и медианы. Нормальность распределения определяли по методу Колмогорова – Смирнова. Для межгрупповых сравнений количественных показателей применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) или непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни, при множественных сравнениях — тест Тьюки (Tukey's HSD) или Данна (Dunn's test). Поправку на множественные сравнения проводили по методу Холма – Бонферрони. При использовании статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты

Оценка аттенуационного (*att*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2

При экспериментальном заражении *ca* вариантами SARS-CoV-2 у сирийских хомяков не наблюдалась задержка в приросте веса и изменений в поведении по сравнению с отрицательным контролем — незараженными животными (ANOVA: $F = 0,57$, $p = 0,97$). Напротив, при заражении вирулентным штаммом Dubrovka со 2-го по 6-й день отмечалась задержка в приросте веса, достигавшая максимальных значений в 13,4 % на 4-й день и 10,1 % — на 6-й день (рис. 1), а также снижение аппетита, вялость и сонливость. Различия в весе наблюдались в сравнении как с *ca*-вариантами SARS-CoV-2, так и с контрольной группой на 4-й день (ANOVA: $F = 32,88$, $p = 0,00001$) и на 6-й день (ANOVA: $F = 7,211$, $p = 0,001$).

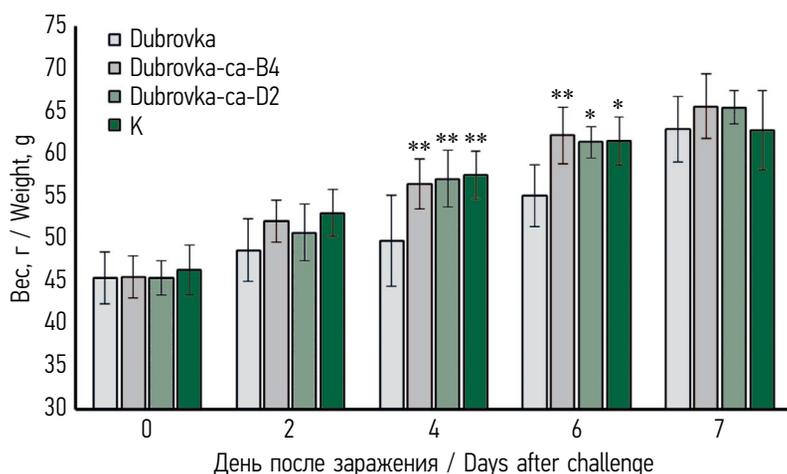


Рис. 1. Динамика веса хомяков, интраназально зараженных вариантами SARS-CoV-2. К — незараженные хомяки. Среднее значение \pm SD. Тест Тьюки (Post Hoc Tukey HSD): ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, в сравнении с группой животных, зараженных штаммом Dubrovka

Fig. 1. Weight of hamsters infected intranasally with SARS-CoV-2 variants. К — uninfected hamsters. Mean \pm SD. Post Hoc Tukey HSD: ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, compared with a group infected with the Dubrovka variant

К 7-му дню после заражения вес животных сравнялся между всеми группами.

В легких и мозге животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса концентрация вирусной РНК и титр вируса была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой, зараженной вирулентным штаммом Dubrovka (рис. 2). Наименьшая концентрация вирусной РНК в органах наблюдалась при заражении вариантом Dubrovka-*ca*-D2 — в легких 6,5 lg копий РНК/мл ($Z = 2,84$, $p = 0,004$, post-hoc Dunn's test, с поправкой Холма — Бонферрони), в мозге 3,3 lg копий РНК/мл ($Z = 3,1$, $p = 0,001$), что на 1,6 и 3,2 lg

соответственно ниже, чем в контрольной группе. Титр вируса в гомогенатах легких животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса составлял 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, что на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе ($Z = 2,38$, $p = 0,02$). Инфекционный вирус в мозге на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами не обнаруживался, тогда как при заражении штаммом Dubrovka достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл гомогената.

При гистологическом исследовании в препаратах легких незараженных хомяков патологических изменений выявлено не было. На 4-е сутки после иммунизации SARS-CoV-2 в легких всех

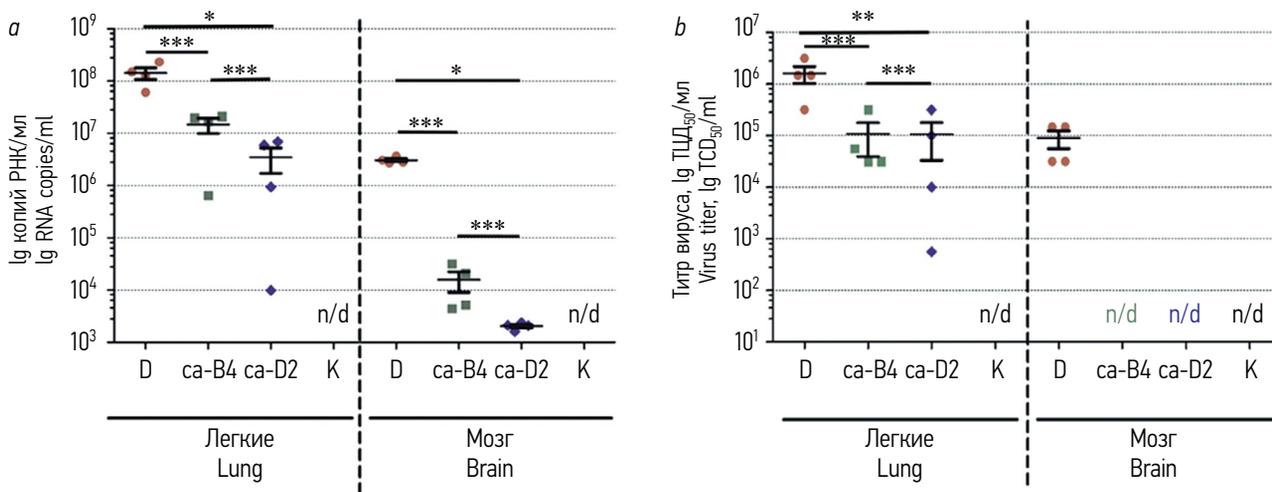


Рис. 2. Распределение вируса в легких и мозге хомяков на 4-е сутки после заражения: *a* — концентрация вирусной РНК; *b* — титр вируса. D — штамм Dubrovka; *ca*-B4 — вариант Dubrovka-*ca*-B4; *ca*-D2 — вариант Dubrovka-*ca*-D2; K — незараженные хомяки; n/d — не обнаружено. Медиана \pm интерквартильный размах ($n = 4$). Тест Данна (post-hoc Dunn's test) с поправкой Холма — Бонферрони: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p > 0,05$

Fig. 2. Virus distribution in the lungs and brain of hamsters, 4th day after challenge: *a* — the viral RNA concentration; *b* — virus titer. D — Dubrovka strain; *ca*-B4 — Dubrovka-*ca*-B4 variant; *ca*-D2 — Dubrovka-*ca*-D2 variant; K — uninfected hamsters; n/d — not detected. Median \pm interquartile range ($n = 4$). Post-hoc Dunn's test with Holm-Bonferroni correction: * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p > 0.05$

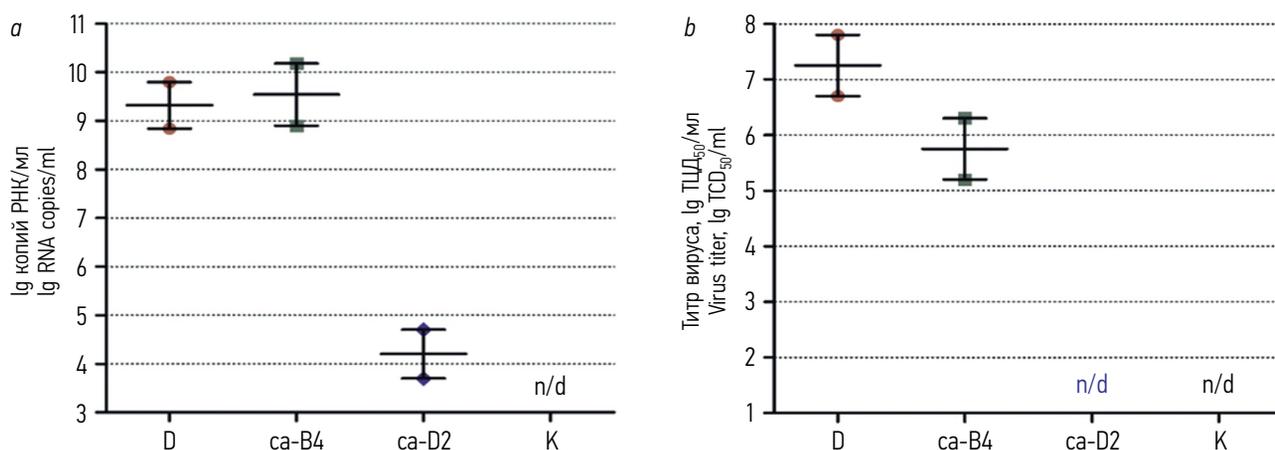


Рис. 3. Показатели репродукции вариантов SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero на 3-и сутки п. и. (39 °С, MOI 0,001): *a* — концентрация вирусной РНК; *b* — титр вируса. D — штамм Dubrovka; ca-B4 — вариант Dubrovka-ca-B4; ca-D2 — вариант Dubrovka-ca-D2; K — незараженные хомяки; n/d — не обнаружено. Данные двух независимых экспериментов; пороговое значение методов детекции: титрование — 1,0 lg TCID₅₀/мл, ОТ-ПЦР-РВ — 3,0 lg копий РНК/мл

Fig. 3. Reproduction rate of SARS-CoV-2 variants in Vero cells on day 3 p.i. (39 °C, MOI 0.001): *a* — the concentration of viral RNA; *b* — virus titer. D — Dubrovka strain; ca-B4 — Dubrovka-ca-B4 variant; ca-D2 — Dubrovka-ca-D2 variant; K — uninfected hamsters; n/d — not detected. Data from two independent experiments; threshold value of detection methods: Titration — 1.0 lg TCID₅₀/ml, real-time RT-PCR — 3.0 lg RNA copies/ml

экспериментальных групп развивались воспалительные изменения, соответствовавшие вирусной (интерстициальной) пневмонии. Однако между группами отмечены существенные отличия по выраженности и распространенности воспалительных изменений. Так, при заражении вирулентным штаммом Dubrovka в легких хомяков развивалась долевая вирусная пневмония, которая сопровождалась выраженными альтеративными и воспалительными изменениями в респираторном отделе: образованием обширных сливных безвоздушных очагов пневмонии, десквамацией и гибелью респираторного эпителия, образованием перибронхиальной и периваскулярной лимфогистиоцитарной инфильтрации, воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, выраженным полнокровием сосудов и микрососудов, периваскулярным отеком, интраальвеолярным и интерстициальным отеком, интраальвеолярными кровоизлияниями.

На 4-е сутки после заражения вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 распространенность и выраженность альтеративно-воспалительных изменений в легких сирийских хомяков были ниже, чем в группе, зараженной штаммом Dubrovka. В частности, в респираторном тракте отсутствовали признаки нарушения кровообращения и выраженного повреждения межальвеолярных перегородок

Сопоставление полученных результатов по изменению веса животных, интенсивности вирусной репродукции в легких и мозге, а также гистологического исследования органов показало наличие у *ca*-вариантов Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 *att*-фенотипа для сирийских хомяков.

Выявление маркеров аттенуации *ca*-вариантов SARS-CoV-2 *in vitro*

Установлено, что при температуре 39 °С вариант Dubrovka-ca-D2 не размножается в культуре клеток Vero (рис. 3), то есть, обладает выраженным *ts*-фенотипом. Штамм Dubrovka и вариант Dubrovka-ca-B4 *ts* фенотипом не обладали.

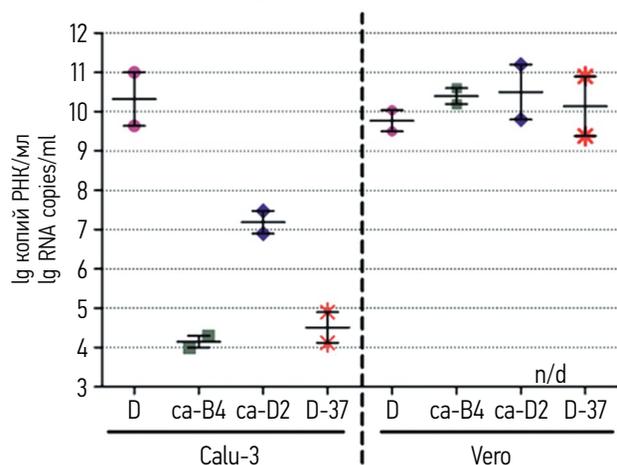


Рис. 4. Концентрация вирусной РНК в культурах клеток Calu-3 и Vero, зараженных вариантами SARS-CoV-2 на 3-и сутки п. и. (MOI 0,001). D — штамм Dubrovka (2-й пассаж); ca-B4 — вариант Dubrovka-ca-B4; ca-D2 — вариант Dubrovka-ca-D2; D-37 — вариант Dubrovka-37. Данные двух независимых экспериментов; пороговое значение для реакции ОТ-ПЦР-РВ — 3,0 lg копий РНК/мл

Fig. 4. The concentration of viral RNA in Calu-3 and Vero cells infected with SARS-CoV-2 variants on day 3 of p.i. (MOI 0.001). D — Dubrovka strain (2nd passage); ca-B4 — Dubrovka-ca-B4 variant; ca-D2 — Dubrovka-ca-D2 variant; D-37 — Dubrovka-37 variant. Data from two independent experiments; the threshold value for the real-time RT-PCR is 3.0 lg RNA copies/ml

Для адаптированных к культуре клеток Vero вариантов Dubrovka-37, Dubrovka-ca-D2 и Dubrovka-ca-B4 концентрация вирусной РНК в культуре клеток легких человека Calu-3 на 3-и сутки п. и. была на 3,0–6,0 lg ниже по сравнению с диким штаммом Dubrovka (2-й пассаж) при температуре культивирования 37 °С (рис. 4). При этом репродуктивная активность всех вариантов вируса в клетках Vero была высокой и не имела выраженных отличий от других вариантов.

Обсуждение

В многочисленных исследованиях доказано, что вирусы человека и животных могут быть адаптированы к росту при пониженной температуре с приобретением *ts*- и *att*-фенотипа. Так, холодовая адаптация вируса применялась при разработке вакцин против таких вирусных инфекций, как полиомиелит, краснуха, натуральная оспа, бешенство, грипп и др. [12–15]. Разработанные в СССР и США живые гриппозные вакцины используются интраназально и выгодно отличаются от инактивированных вакцин тем, что индуцируют не только системный, но и местный мукозальный иммунитет, сочетают перекрестную протективную активность и простоту введения [14–17]. По аналогии с живыми гриппозными вакцинами в Южной Корее и Японии получены аттенуированные *ca*-штаммы SARS-CoV-2, проводятся их исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов [18, 19].

Att-фенотип вируса может проявляться *in vitro* в снижении вирусной репродукции в индикаторной культуре клеток по сравнению с вирулентным штаммом. Традиционный подход к выявлению маркеров аттенуации — определение инфекционного титра вируса [12, 20]. В настоящем исследовании и в ряде аналогичных работ в качестве альтернативного подхода к оценке интенсивности вирусной репродукции применяется определение концентрации вирусной РНК, косвенно отражающей накопление инфекционного вируса [18, 21, 22]. Применение ОТ–ПЦР–РВ, в отличие от титрования, позволяет проводить мониторинг вирусной репродукции с высокой чувствительностью и специфичностью, одновременно снижая длительность и трудоемкость анализа.

При экспериментальном заражении сирийских хомяков (животная модель COVID-19) *ca*-вариантами вируса показано, что *att*-фенотип свойственен как варианту Dubrovka-ca-D2, обладающему *ts*-фенотипом, так и варианту Dubrovka-ca-B4, не имеющему *ts*-фенотипа.

В то же время все исследованные варианты вируса, длительно пассированные в клетках почки обезьяны Vero (Dubrovka-37, Dubrovka-ca-D2 и Dubrovka-ca-B4), утратили способность

эффективно размножаться в клетках легких человека Calu-3. Вероятнее всего это связано с генетически опосредованными изменениями конформации S-белка — приспособительной реакцией вируса при культивировании в клетках другого хозяина (африканской зеленой марьяшки, *Cercopithecus aethiops*) вместо клеток человека, и в клетках другой ткани — в почках вместо легких. Первичный анализ геномов Dubrovka-37 (номер GenBank: ON380441.1), Dubrovka-ca-B4 (номер GenBank: ON059701.1) и Dubrovka-ca-D2 (номер GenBank: ON040961.1) выявил до 20 нуклеотидных замен по сравнению с диким штаммом Dubrovka, большинство из которых приводило к замене аминокислоты. Выявленная смена видовой и/или тканевой специфичности вируса согласуется с тем, что в гене S-белка локализовано наибольшее число значащих нуклеотидных замен у вариантов: Dubrovka-37 — 2, Dubrovka-ca-B4 — 6, Dubrovka-ca-D2 — 7 аминокислотных замен. Однако достоверно роль выявленных мутаций в проявлении того или иного фенотипа можно определить, только применяя методы сайт-направленного мутагенеза и обратной генетики.

Полученные результаты позволили выявить вероятные фенотипические маркеры аттенуации *ca*-вариантов вируса для сирийских хомяков: (1) способность размножаться при пониженной температуре (*ca*-фенотип); (2) неспособность размножаться при 39 °С (*ts*-фенотип); (3) изменение видовой и/или тканевой специфичности вируса, проявляющееся в неспособности эффективно размножаться в клетках легких человека Calu-3. Аттенуационный фенотип был получен для сирийских хомяков и требует дальнейшего исследования на других моделях. Разработанные методики оценки *in vitro* вероятных маркеров аттенуации могут служить дополнительными скрининговыми методами оценки аттенуированности вируса. Однако для доказательства связи выявляемых маркеров с *att*-фенотипом вируса необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

По результатам исследования было установлено, что *ca*-варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 обладают *att*-фенотипом в отношении сирийских хомяков. В условиях *in vitro* выявлены вероятные маркеры аттенуации *ca*-вариантов SARS-CoV-2 — *ca*-фенотип, *ts*-фенотип и неспособность эффективно размножаться в клетках легких человека Calu-3. Разработанные методические подходы к выявлению *in vitro* маркеров аттенуации SARS-CoV-2 представляют ценные инструменты контроля стабильности фенотипа кандидатных вакцинных штаммов.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079.

Соблюдение этических норм. Проведение исследования разрешено Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (этическая экспертиза от 24.05.2021, протокол № 2). Все работы с животными проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с подготовкой и публикацией статьи.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.В. Грачева, Е.Р. Корчевая, Е.Б. Файзулов* — подготовка первоначального варианта рукописи, визуализация; *А.В. Грачева, Е.Р. Корчевая, Д.И. Смирнова, Р.В. Самойликов, А.А. Поромов* — проведение исследования и анализ данных; *А.А. Панкратов, Г.В. Трунова, В.А. Хохлова* — гистологическое исследование; *И.А. Ленева, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Ф.Г. Нагиева* — администрирование проекта.

Additional information

Funding sources. The study was performed with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research, No. 20-04-60079.

Compliance with ethical standards. This study was approved by the Medical Ethics Review Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Ethics Committee Decision No. 2 dated May 24, 2021). All work with animals was carried out in accordance with European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Competing interests. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Authors' contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication. The largest contribution is distributed as follows: *A.V. Gracheva, E.R. Korchevaya, E.B. Faizuloev* — preparation of the initial version of the manuscript, visualization; *A.V. Gracheva, E.R. Korchevaya, D.I. Smirnova, R.V. Samoilikov, A.A. Poromov* — conducting research and data analysis; *A.A. Pankratov, G.V. Trunova,*

V.A. Khokhlova — histological examination; *I.A. Leneva, O.A. Svitich, V.V. Zverev, F.G. Nagieva, E.B. Faizuloev* — project administration.

Список литературы

- Gómez-Carballa A., Pardo-Seco J., Bello X. et al. Superspreading in the emergence of COVID-19 variants // *Trends Genet.* 2021. Vol. 37, No. 12. P. 1069–1080. DOI: 10.1016/j.tig.2021.09.003
- Nikonova A.A., Faizuloev E.B., Gracheva A.V. et al. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2 // *Acta Naturae.* 2021. Vol. 13, No. 3. P. 77–88. DOI: 10.32607/actanaturae.11337
- Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 variants of concern // *Yonsei Med. J.* 2021. Vol. 62, No. 11. P. 961–968. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961
- Dupont L., Snell L.B., Graham C. et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern // *Nat. Microbiol.* 2021. Vol. 6, No. 11. P. 1433–1442. DOI: 10.1038/s41564-021-00974-0
- Tao K., Tzou P.L., Nouhin J. et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants // *Nat. Rev. Genet.* 2021. Vol. 22, No. 12. P. 757–773. DOI: 10.1038/s41576-021-00408-x
- Saito A., Irie T., Suzuki R. et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation // *Nature.* 2022. Vol. 602, No. 7896. P. 300–306. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9
- Bowen J.E., Sprouse K.R., Walls A.C. et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines // *bioRxiv.* 2022. DOI: 10.1101/2022.03.15.484542
- Файзулов Е.Б., Грачева А.В., Корчевая Е.Р. и др. Получение и характеристика холодадаптированного штамма коронавируса SARS-CoV-2 // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы», Москва, 7–8 октября 2021 г. Москва, 2021. С. 79.
- Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М. и др. 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
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula // *World J. Virol.* 2016. Vol. 5, No. 2. P. 85–86. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K. et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2020. Vol. 58, No. 5. P. e00310–20. DOI: 10.1128/JCM.00310-20
- Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines // *Vaccine.* 1985. Vol. 3, No. 5. P. 355–369. DOI: 10.1016/0264-410x(85)90124-0
- Alexandrova G.I., Smorodinstev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophil influenza strain // *Revue Roumaine d'Inframicrobiologie.* 1965. Vol. 2, No. 3. P. 179–186.
- Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V. et al. 1984. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants // *Infect. Immun.* 1984. Vol. 44, No. 3. P. 730–733. DOI: 10.1128/IAI.44.3.730-733.1984

15. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c // *Nature*. 1967. Vol. 213, No. 5076. P. 612–614. DOI: 10.1038/213612a0
16. Rudenko L.G., Slepushkin A.N., Monto A.S. et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia // *J. Infect. Dis.* 1993. Vol. 168, No. 4. P. 881–887. DOI: 10.1093/infdis/168.4.881
17. Lu X., Edwards L.E., Desheva J.A. et al. Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses // *Vaccine*. 2006. Vol. 24, No. 44–46. P. 6588–6593. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.039
18. Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-Cov-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-Cov-2 infection // *Vaccines (Basel)*. 2020. Vol. 8, No. 4. P. 584. DOI: 10.3390/vaccines8040584
19. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? // *Vaccine*. 2021. Vol. 39, No. 39. P. 5719–5726. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.018
20. Tsfasman T.M., Markushin S.G., Akopova I.I., Ghendon YZ. Molecular mechanisms of reversion to the ts+ (non-temperature-sensitive) phenotype of influenza A cold-adapted (ca) virus strains // *J. Gen. Virol.* 2007. Vol. 88, No. Pt 10. P. 2724–2729. DOI: 10.1099/vir.0.83014-0
21. Ammour Y., Faizuloev E., Borisova T. et al. Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay // *J. Virol. Methods*. 2013. Vol. 187, No. 1. P. 57–64. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.09.011
22. Landgraf G., Desheva Y.A., Rudenko L.G. Evaluation of influenza A and B cold-adapted reassortant virus reproduction in trivalent live influenza vaccines // *Virus Res*. 2021. Vol. 300. P. 198396. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198396
9. Gracheva AV, Korchevaya ER, Kudryashova AM, et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2021;98(3):253–265. (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-136
10. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016;5(2):85–86. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85
11. Chan JF, Yip CC, To KK, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2020;58(5):e00310–20. DOI: 10.1128/JCM.00310-20
12. Maassab HF, DeBorde DC. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine*. 1985;3(5):355–369. DOI: 10.1016/0264-410x(85)90124-0
13. Alexandrova GI, Smorodinstev AA. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophil influenza strain. *Revue Roumaine d'Inframicrobiologie*. 1965;2(3):179–186.
14. Ghendon YZ, Polezhaev FI, Lisovskaya KV, et al. 1984. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect Immun*. 1984;44(3):730–733. DOI: 10.1128/IAI.44.3.730-733.1984
15. Maassab HF. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature*. 1967;213(5076):612–614. DOI: 10.1038/213612a0
16. Rudenko LG, Slepushkin AN, Monto AS, et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia. *J Infect Dis*. 1993;168(4):881–887. DOI: 10.1093/infdis/168.4.881
17. Lu X, Edwards LE, Desheva JA, et al. Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses. *Vaccine*. 2006;24(44–46):6588–6593. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.039
18. Seo SH, Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-Cov-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-Cov-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):584. DOI: 10.3390/vaccines8040584
19. Okamura S, Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? *Vaccine*. 2021;39(39):5719–5726. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.018
20. Tsfasman TM, Markushin SG, Akopova II, Ghendon YZ. Molecular mechanisms of reversion to the ts+ (non-temperature-sensitive) phenotype of influenza A cold-adapted (ca) virus strains. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 10):2724–2729. DOI: 10.1099/vir.0.83014-0
21. Ammour Y, Faizuloev E, Borisova T, et al. Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2013;187(1):57–64. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.09.011
22. Landgraf G, Desheva YA, Rudenko LG. Evaluation of influenza A and B cold-adapted reassortant virus reproduction in trivalent live influenza vaccines. *Virus Res*. 2021;300:198396. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198396

References

1. Gómez-Carballa A, Pardo-Seco J, Bello X, et al. Super-spreading in the emergence of COVID-19 variants. *Trends Genet*. 2021;37(12):1069–1080. DOI: 10.1016/j.tig.2021.09.003
2. Nikonova AA, Faizuloev EB, Gracheva AV, et al. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2. *Acta Naturae*. 2021;13(3):77–88. DOI: 10.32607/actanaturae.11337
3. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med J*. 2021;62(11):961–968. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961
4. Dupont L, Snell LB, Graham C, et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat Microbiol*. 2021;6(11):1433–1442. DOI: 10.1038/s41564-021-00974-0
5. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet*. 2021;22(12):757–773. DOI: 10.1038/s41576-021-00408-x
6. Saito A, Irie T, Suzuki R, et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*. 2022;602(7896):300–306. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9
7. Bowen JE, Sprouse KR, Walls AC, et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines. *bioRxiv*. 2022. DOI: 10.1101/2022.03.15.484542
8. Fajzuloev EB, Gracheva AV, Korchevaya ER, et al. Poluchenie i harakteristika holodoadaptirovannogo shtamma koronavi-

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБОУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия
 I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Анастасия Вячеславовна Грачева — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>;
 e-mail: anastasiia.gracheva.95@mail.ru

Anastasiia V. Gracheva — Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Virology, Department of Virology.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>;
 e-mail: anastasiia.gracheva.95@mail.ru

Екатерина Романовна Корчевая — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>;
 Scopus Author ID: 57225930677;
 e-mail: c.korchevaya@gmail.com

Ekaterina R. Korchevaya — Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Virology, Department of Virology.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>;
 Scopus Author ID: 57225930677;
 e-mail: c.korchevaya@gmail.com

Роман Владимирович Самойликов — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>;
 e-mail: roma_sam78@mail.ru

Roman V. Samoilikov — Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Department of Virology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>;
 e-mail: roma_sam78@mail.ru

Дарья Ильинична Смирнова — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>;
 e-mail: daria.sm.1995@mail.ru

Daria I. Smirnova — Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Virology, Department of Virology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>;
 e-mail: daria.sm.1995@mail.ru

Ирина Анатольевна Ленева — д-р биол. наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>;
 e-mail: wnyfd385@yandex.ru

Irina A. Leneva — Dr. Sci. (Biol.), Head of Experimental Virology Laboratory, Department of Virology.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>;
 e-mail: wnyfd385@yandex.ru

Артём Андреевич Поромов — старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2004-3935>;
 Scopus Author ID: 56636881200;
 e-mail: poromov@instmech.ru

Artem A. Poromov — Senior Research Associate of Experimental Virology Laboratory, Department of Virology.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2004-3935>;
 Scopus Author ID: 56636881200;
 e-mail: poromov@instmech.ru

Фирая Галиевна Нагиева — д-р мед. наук, доцент, заведующая лабораторией гибридных клеточных культур Отдела вирусологии.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>;
 Scopus Author ID: 6701793390; e-mail: fgn42@yandex.ru

Firaya G. Nagieva — MD, Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>;
 Scopus Author ID: 6701793390; e-mail: fgn42@yandex.ru

Оксана Анатольевна Свитич — д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;
 e-mail: svitichoa@yandex.ru

Oksana A. Svitich — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Head of Molecular Immunology Laboratory, Director.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;
 e-mail: svitichoa@yandex.ru

Виталий Васильевич Зверев — д-р биол. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>;
 e-mail: vitalyzverev@outlook.com

Vitaly V. Zverev — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of the RAS, Scientific Director.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>;
 e-mail: vitalyzverev@outlook.com

ФГБОУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
 National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Андрей Александрович Панкратов — канд. биол. наук, заведующий микрохирургическим отделением МНИОИ им. П.А. Герцена.
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>;
 Scopus Author ID: 7006145091;
 e-mail: andreimnioi@yandex.ru

Andrey A. Pankratov — Cand. Sci. (Biol.), Head of Microsurgical Department, Hertzen Moscow Oncological Institute. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>;
 Scopus Author ID: 7006145091;
 e-mail: andreimnioi@yandex.ru

Информация об авторах / Information about the authors

Галина Владимировна Трунова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена.
E-mail: gtrunovamnioi@mail.ru

Galina V. Trunova — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate, Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Herten Moscow Oncological Institute.
E-mail: gtrunovamnioi@mail.ru

Варвара Андреевна Хохлова — младший научный сотрудник отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена.
E-mail: nostocus@yandex.ru

Varvara A. Khokhlova — Junior Research Associate, Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Herten Moscow Oncological Institute.
E-mail: nostocus@yandex.ru

ФГБОУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Евгений Бахтиерович Файзулов — канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии Отдела вирусологии.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>;
Scopus Author ID: 23472535800; e-mail: faizuloev@mail.ru

Evgeny B. Faizuloev — Cand. Sci. (Biol.), Head of Molecular Virology Laboratory, Department of Virology.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>;
Scopus Author ID: 23472535800; e-mail: faizuloev@mail.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Анастасия Вячеславовна Грачева / Anastasiia V. Gracheva
Адрес: Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д. 5а
Address: 5a Malyi Kazennyi lane, Moscow, 105064, Russia
E-mail: anastasiia.gracheva.95@mail.ru