

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

На правах рукописи

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

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Даниленко Дарья Михайловна

Санкт-Петербург
2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Общие характеристики вируса парагриппа человека	15
1.1.1 История открытий.....	15
1.1.2 Таксономия и классификация.....	17
1.2 Вирион и организация генома	20
1.2.1 Структура вириона.....	20
1.2.2 Организация генома.....	21
1.2.3 Вирусные белки и их антигенная структура	25
1.3 Молекулярная биология репликации hPIV.....	31
1.3.1 Компоненты аппарата синтеза РНК	31
1.3.2 Транскрипция и репликация генома	31
1.4 Эпидемиология и клинические проявления вирусов парагриппа человека	34
1.5 Подходы к секвенированию вирусов парагриппа человека	36
1.5.1 Ранние подходы к молекулярному анализу hPIV.....	36
1.5.2 Высокопроизводительное и полногеномное секвенирование hPIV	38
1.5.3 Ампликонные подходы к полногеномному секвенированию	40
1.5.4 Метагеномные подходы к полногеномному секвенированию	43
1.6 Молекулярная эпидемиология и филогенетический анализ hPIV	47
1.7 Выделение вирусов парагриппа человека в клеточных культурах	60
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
2.1 Материалы исследования	63
2.1.1 Исследованные образцы	63
2.1.2 Вирусы	63
2.1.3 Клеточные линии.....	63
2.2 Методы исследования	64
2.2.1 Выделение РНК	64
2.2.2 Детекция респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР в реальном времени	64
2.2.3 Выделение hPIV в клеточной культуре LLC-MK2 и MA-104	65

2.2.4	Разработка панелей праймеров для полногеномной амплификации генома вирусов парагриппа человека	66
2.2.5	Тест специфичности разработанных панелей праймеров	71
2.2.6	Аналитическая чувствительность разработанных панелей праймеров.....	71
2.2.7	Тест робастности разработанных панелей праймеров	72
2.2.8	Полногеномная амплификация hPIV1, hPIV2 и hPIV3.....	72
2.2.9	Полногеномная амплификация hPIV4	72
2.2.10	Секвенирование hPIV	74
2.2.11	Биоинформатический анализ данных.....	74
2.2.12	Выборка последовательностей для филогенетического анализа	76
2.2.13	Доступность данных	76
2.2.14	Статистический анализ	77
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	78
3.1	Распространенность вируса парагриппа человека	78
3.2	Выделение hPIV в клеточной культуре LLC-MK2 и MA-104	82
3.3	Разработка праймерной панели и её апробация на клинических образцах.....	88
3.4	Тест на специфичность разработанных панелей праймеров	91
3.5	Аналитическая чувствительность разработанных панелей праймеров.....	92
3.6	Тест робастности разработанных панелей праймеров	94
3.7	Амплификация всего генома hPIV4 с использованием амплификации SMART-9N	95
3.8	Сравнение последовательностей hPIV из клинических образцов и выделенных из них культивированных изолятов	96
3.9	Филогенетический анализ на основе всего генома	99
3.9.1	Филогенетический анализ hPIV1.....	100
3.9.2	Филогенетический анализ hPIV2.....	105
3.9.3	Филогенетический анализ hPIV3.....	110
3.9.4	Филогенетический анализ hPIV4.....	117
3.10	Филогенетический анализ на основе гена HN и анализ аминокислотных замен	122
3.10.1	Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV1	122
3.10.2	Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV2.....	126
3.10.3	Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV3	129
3.10.4	Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV4.....	132
3.11	Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN	135

3.11.1	Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV1 ...	136
3.11.2	Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV2 ...	137
3.11.3	Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV3 ...	138
3.11.4	Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV4....	138
3.12	Анализ рекомбинации.....	139
4.	ОБСУЖДЕНИЕ.....	141
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	159
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	162
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	164
	ПРИЛОЖЕНИЕ	194

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заболевания верхних и нижних дыхательных путей представляют собой глобальную проблему общественного здравоохранения, ежегодно затрагивающую миллионы людей во всём мире. Эти заболевания варьируют от легко протекающих инфекций до тяжёлых состояний, требующих госпитализации, а также могут переходить в хронические респираторные патологии. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) остаются ведущей причиной инфекционной заболеваемости во всём мире, особенно среди уязвимых групп населения, таких как дети раннего возраста, пожилые люди и пациенты с хроническими заболеваниями или иммунодефицитными состояниями [1]. Помимо медицинских последствий, респираторные инфекции создают значительное экономическое бремя вследствие расходов на здравоохранение и потери трудоспособности. В связи с этим непрерывный эпидемиологический мониторинг и сочетанные с ним научные исследования, направленные на изучение эволюции и биологических особенностей респираторных вирусов, остаются необходимыми для совершенствования мер диагностики, профилактики и лечения ОРВИ [2,3].

Вирусы парагриппа человека (hPIV) относятся к числу значимых этиологических агентов острых респираторных инфекций. Эти вирусы были впервые идентифицированы в конце 1950-х годов, когда от детей с заболеваниями нижних дыхательных путей было выделено несколько ранее неизвестных респираторных вирусов. Несмотря на определённое структурное сходство с вирусами гриппа, hPIV имеют значительные биологические и антигенные отличия. Обнаружение дополнительных, родственных с hPIV вирусов, привело к выделению самостоятельной таксономической группы, получившей название вирусов парагриппа [4]. Установлено, что вирусы парагриппа способны вызывать широкий спектр клинических проявлений, включая ринит, отит, ларинготрахеобронхит, круп, бронхиолит и пневмонию как у детей, так и у взрослых [5,6]. Сезонные вспышки заболеваемости, вызванной вирусами парагриппа, вносят значительный вклад в общую структуру респираторной заболеваемости во всём мире [7–9]. У госпитализированных с ОРВИ детей, инфекции, вызванные hPIV, составляют около 40 %, а при госпитализации с крупом - до 75 % случаев, уступая по значимости лишь респираторно-синцитиальному вирусу как причине тяжёлых острых респираторных заболеваний. У пожилых пациентов и лиц с иммунодефицитными состояниями инфекции, вызванные вирусами парагриппа, могут прогрессировать до тяжёлой и потенциально угрожающей жизни пневмонии [10,11].

На основании генетических, антигенных и морфологических характеристик вирусы парагриппа человека подразделяются на четыре типа (hPIV1–4). При этом hPIV1 и hPIV3 относятся к роду *Respirovirus*, а hPIV2 и hPIV4 относятся к роду *Orthorubulavirus*, согласно современной классификации международного комитета по таксономии вирусов ICTV. Геном вируса кодирует шесть структурных белков, среди которых особое значение имеет поверхностный гликопротеин гемагглютинин-нейраминидаза (HN). Белок HN обеспечивает прикрепление вируса к клеткам хозяина, участвует в процессе мембранного слияния и способствует выходу вирусных частиц из инфицированных клеток. Благодаря своим ключевым биологическим функциям и антигенной вариабельности белок HN является важной мишенью при проведении молекулярной характеристики и филогенетических исследований вирусов парагриппа [12,13]. Ген HN исторически широко использовался в качестве молекулярного маркера в эпидемиологических исследованиях и при генетическом типировании циркулирующих вирусных штаммов [14,15].

Несмотря на признанную медицинскую значимость вирусов парагриппа человека, объём доступной геномной информации о данных вирусах остаётся относительно ограниченным. Большинство последовательностей, представленных в международных базах данных, содержат лишь фрагменты генома, чаще всего ген HN, и характеризуются неравномерным географическим распределением. Такие ограничения затрудняют комплексный анализ генетического разнообразия и молекулярных характеристик циркулирующих вирусов, а также ограничивают возможности сопоставления вирусных штаммов, выявленных в различных регионах мира. В связи с этим формирование наборов данных полногеномных последовательностей имеет особое значение для современной молекулярной эпидемиологии. Полногеномное секвенирование позволяет проводить детальную характеристику вирусных геномов, выявлять генетические варианты и сопоставлять циркулирующие штаммы в широком глобальном контексте. Наличие таких геномных данных создаёт основу для мониторинга вирусного разнообразия, совершенствования диагностических подходов и укрепления международных систем эпидемиологического надзора за респираторными патогенами.

В Российской Федерации систематический геномный мониторинг вирусов парагриппа человека до настоящего времени не проводился, а комплексные молекулярно-генетические данные о циркулирующих штаммах практически отсутствуют. До проведения настоящего исследования полногеномные последовательности hPIV, выявленных на территории России, в международных

базах данных не были представлены, что существенно ограничивало возможности детального сравнительного анализа с вирусами, циркулирующими в других регионах мира. В этой связи получение и анализ полных геномных последовательностей вирусов парагриппа человека, циркулирующих в Санкт-Петербурге, представляет собой важный шаг к углублению молекулярной характеристики данных возбудителей и расширению глобального геномного массива данных, используемого в исследованиях респираторных вирусов.

Степень разработанности проблемы

Молекулярно-эпидемиологические исследования вирусов парагриппа человека проводились рядом исследовательских групп и представлены в работах Mao, Shao, Bose, Zhu, Bisi, Smielewska и ряда других исследователей, и посвящены изучению генетического разнообразия hPIV, их филогенетической структуры и разработке подходов к полногеномному секвенированию. Необходимо отметить, что в течение длительного времени филогенетические исследования hPIV основывались преимущественно на анализе отдельных геномных регионов, прежде всего гена HN. Такой подход позволил описать основные филогенетические группы различных типов hPIV, изучить их циркуляцию в отдельных странах и выявить ряд закономерностей генетической диверсификации вирусов [16–18]. 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. Кроме того, отсутствие данных о полном геноме вируса не позволяет полноценно проводить анализ событий рекомбинации.

В последние годы полногеномное секвенирование стало всё активнее применяться для изучения hPIV, что можно проследить в исследованиях Bose и Zhu, однако количество доступных полных геномов остаётся ограниченным по сравнению с другими респираторными вирусами, а географическая представленность данных остаётся неравномерной [18,19]. При этом, несмотря на ряд современных исследований, выполненных Bisi и Smielewska [20,21] на высоком методическом уровне, число опубликованных и валидированных подходов для эффективного получения полных геномов hPIV непосредственно из клинического материала остаётся ограниченным, что сужает возможности рутинного геномного мониторинга этих вирусов.

Наиболее существенный пробел сохранялся в отношении вирусов парагриппа человека, циркулирующих в Российской Федерации. До настоящего исследования комплексные

полногеномные данные о российских штаммах hPIV1–4 в международных базах данных отсутствовали, а их генетическое разнообразие и положение в глобальной филогенетической структуре оставались неизученными. Таким образом, проблема молекулярно-генетической характеристики вирусов парагриппа человека, циркулирующих на территории России, оставалась недостаточно 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

Целью настоящего исследования являлось проведение молекулярного и филогенетического анализа вирусов парагриппа человека типов 1–4, циркулирующих в Санкт-Петербурге в течение восьми эпидемических сезонов с 2017 по 2025 гг., на основе полных геномных последовательностей вирусов.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выделение вирусов парагриппа человека в культурах клеток МА-104 и LLC-MK2 с целью формирования коллекции вирусных изолятов и выбора современных типовых представителей каждого типа hPIV для валидации панели праймеров для полногеномного секвенирования, а также проведения оценки возможных адаптационных изменений вирусов при культивировании.
2. Разработка, валидация и применение 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 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 работы

Впервые в Российской Федерации проверено комплексное молекулярно-генетическое исследование вирусов парагриппа, циркулировавших в эпидемических сезонах 2017-2025 гг. Санкт-Петербурге. Доказана возможность применения праймерных панелей для полногеномной амплификации для получения полногеномных последовательностей парагриппа 1-3 типов непосредственно из клинических образцов. Для проведения валидации панели были использованы не только типовые штаммы, полученные из коллекции ATCC (Американская коллекция типовых культур), но и проведена экспериментальная вирусологическая работа по выделению современных изолятов вирусов парагриппа всех четырех типов на клеточных культурах MA-104 и LLC-MK2. Изучены биологические свойства вирусов (способность к агглютинации эритроцитов, инфекционная активность), а также выбраны типовые представители каждого типа для проведения валидационных испытаний панели для полногеномной амплификации вирусов парагриппа. Кроме того, 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. В результате получено 453 полногеномные последовательности вирусов парагриппа человека (105 hPIV1, 37 hPIV2, 303 hPIV3 и 8 hPIV4).

Кроме того, проведен подробный филогенетический анализ вирусов парагриппа для полученных полногеномных последовательностей. Установлено, что вирусы парагриппа человека типов 1–4, циркулирующие 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 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 генетической группы. Анализ аминокислотных последовательностей для кластера D выявил значительно более широкий спектр групп-специфичных аминокислотных маркеров, распределённых практически по всем структурным белкам вируса. Наиболее выраженные молекулярные особенности кластера D наблюдались в генах P, HN, F и L, что дополнительно

подтверждает его генетическую обособленность по сравнению с ранее описанными кластерами hPIV3.

Проведен филогенетический анализ для гена HN, кодирующего основной поверхностный гликопротеин вируса, а также проанализировано распределение аминокислотных замен. Показана сходимость результатов филогенетического анализа для гена HN иерархической структуре, выявленной при анализе полных геномов вирусов парагриппа 1-4.

Впервые в России проведен анализ рекомбинационных событий для вирусов парагриппа 1-4 типов с использованием полногеномных последовательностей. Установлено, что для hPIV1 и hPIV4 статистически подтвержденных событий рекомбинации не происходило. Выявлен один рекомбинантный штамм: hPIV2 с точкой рекомбинации, локализованной между позициями нуклеотидов 13,586–14,528 (участок генома, кодирующий белок L), а также два рекомбинантных штамма hPIV3, оба принадлежащие вновь охарактеризованному кластеру D. В обоих штаммах событие рекомбинации охватило область генома между позициями нуклеотидов, кодирующих белок HN.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования расширяют современные представления о генетическом разнообразии и молекулярных особенностях вирусов парагриппа человека, циркулирующих в различных географических регионах.

Теоретическая значимость работы заключается в комплексной характеристике полных геномов вирусов hPIV1–4, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга. Охарактеризована современная этиологическая структура популяции hPIV, циркулирующих на протяжении последних восьми эпидемических сезонов. Проведенный полногеномный филогенетический анализ позволил определить положение российских штаммов среди глобально циркулирующих вариантов и выявить характерные молекулярные особенности отдельных филогенетических групп. Полученные полногеномные последовательности позволили провести анализ рекомбинационных событий в геномах hPIV 1-4 и впервые в России выявить редкие потенциальные события рекомбинации, что расширяет современные представления о механизмах эволюции вирусов парагриппа человека. Кроме того, полногеномные последовательности hPIV3

позволили выявить внутри данного типа отдельный ранее не описанный недано возникший кластер D, группирующийся с современными изолятами парагриппа 3 типа из других стран.

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), позволяют получать качественные полные геномы hPIV 1-3 типов, и могут быть использованы для геномного мониторинга вирусов парагриппа человека. Получены 453 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 MA-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, выделение вирусной РНК, выявление респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР в реальном времени и отбор hPIV-положительных образцов для последующей полногеномной характеристики.

Для получения полных геномных последовательностей hPIV1–3 были разработаны и применены панели праймеров для полногеномной ампликонной амплификации с последующим секвенированием нового поколения. Эффективность разработанных панелей оценивали с использованием тестов специфичности, аналитической чувствительности и робастности. Для получения полных геномов hPIV4 применяли метагеномный подход амплификации SMART-9N, позволяющий проводить обогащение вирусного генетического материала без предварительного знания последовательности генома.

Вирусологическая часть исследования включала выделение вирусов парагриппа человека в культурах клеток MA-104 и LLC-MK2, оценку цитопатического действия, определение гемагглютинирующей и инфекционной активности, а также оценку их антигенных свойств с использованием реакции торможения гемагглютинации и реакции нейтрализации.

Биоинформатический анализ включал сборку консенсусных геномных последовательностей, оценку качества покрытия, множественное выравнивание последовательностей, построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия, расчёт попарных генетических расстояний, анализ аминокислотных замен, прогнозирование потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования и выявление потенциальных событий рекомбинации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Современные изоляты четырёх типов вирусов парагриппа человека сохраняют ранее описанные для каждого типа биологические свойства.
2. Разработанные панели праймеров обеспечивают полногеномную амплификацию вирусов парагриппа человека типов hPIV1–3 непосредственно из клинического материала и позволяют оценить генетическое разнообразие hPIV.
3. Филогенетические группы циркулирующих вариантов вирусов hPIV1–4 имеют характерные молекулярные особенности, включая аминокислотные замены, специфичные для каждой группы.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении основных экспериментальных, биоинформатических и аналитических этапов исследования. Автором разработаны и оптимизированы 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 MA-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. Смородинцева» 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).

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 194 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».

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие характеристики вируса парагриппа человека

1.1.1 История открытий

Открытие вирусов парагриппа человека (hPIV) произошло в результате более ранних исследований респираторных патогенов у животных, которые выявили антигенно родственные вирусы и в конечном итоге привели к признанию hPIV как возбудителей респираторных заболеваний человека в конце 1950-х годов, положив начало десятилетиям последующих вирусологических и эпидемиологических исследований [11,22].

Одним из самых ранних представителей этой группы была болезнь Ньюкасла птиц (NDV). Этот вирус впервые был описан после летальной вспышки среди домашней птицы в 1926 году. К последующим изолятам животных, важным для понимания заболеваний человека, относятся вирус Сендай (SeV; выделен в 1952 году и, вероятно, имеет происхождение от грызунов), который показал антигенное родство с вирусом парагриппа человека 1 типа (hPIV1), и бычий вирус парагриппа 3 (выделен в 1959 году), близкий к вирусу парагриппа человека 3 типа (hPIV3). Вирус парагриппа 5, ранее известный как вирус обезьян 5 (SV5), был впервые выделен в 1954 году как частый контаминант первичных клеточных культур из почек обезьян. Он оказался родственным вирусу парагриппа человека 2 типа и был определён как возбудитель «питомникового кашля» у собак. В совокупности эти открытия показали, что родственные респираторные вирусы циркулируют у разных хозяев, и создали сравнительную вирусологическую основу для выявления и классификации четырёх типов вируса парагриппа человека [11].

Систематические вирусологические исследования детей с острыми респираторными заболеваниями в 1950-е годы привели к выявлению четырёх типов вируса парагриппа человека. В знаковой работе в Национальных институтах здравоохранения (НИН) США доктор Роберт М. Чанок и его коллеги впервые идентифицировали hPIV1 и hPIV3 в 1956 году. Эти типы были выделены у детей с крупом и бронхиолитом, причём hPIV3 вызывал тяжёлые респираторные заболевания у маленьких детей [23–25]. Позднее, в 1958 году, был идентифицирован hPIV2, что расширило понимание роли вирусов парагриппа в респираторной патологии. hPIV1, hPIV2 и hPIV3 первоначально были выделены у новорождённых и детей с заболеваниями нижних дыхательных путей. hPIV4 впервые был выделен и идентифицирован в 1959 году Johnson и соавт. у студента с лёгкой инфекцией верхних дыхательных путей [26]. Хотя hPIV4 встречается реже и

подразделяется на подтипы hPIV4a и hPIV4b, обычно он вызывает более лёгкие респираторные симптомы. В совокупности эти открытия установили существование четырёх отдельных типов человека (hPIV1–4), каждый из которых имеет свои эпидемиологические и клинические особенности.

Термин «парагрипп» был введён в этот период для обозначения вирусов, вызывающих заболевание, похожее на грипп, и обладающих определёнными фенотипическими признаками — средний размер вириона, наличие оболочки и поверхностных белков с гемагглютинирующей и нейраминидазной активностью. Хотя первоначально термин применялся более широко к родственным вирусам животных (включая вирус Сендай), в клинической практике он стал использоваться главным образом для четырёх типов вируса парагриппа человека, вызывающих респираторные заболевания [11].

С момента открытия вирусы парагриппа человека активно изучаются из-за их связи с инфекциями дыхательных путей, особенно у детей. В 1970-е и 1980-е годы проводились обширные исследования молекулярной биологии и патогенеза hPIV, чему способствовали достижения в методах клеточных культур и вирусологии [27–29]. Эти исследования углубили понимание структуры вируса, механизмов репликации и иммунного ответа при инфекции hPIV. С 1990-х годов и по настоящее время внедрение молекулярных методов, таких как обратная транскрипция — полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) и секвенирование, революционизировало изучение hPIV. Эти технологии обеспечили более точную и быструю диагностику, детальную генетическую характеристику и комплексный филогенетический анализ штаммов hPIV [17,30–33]. Непрерывный эпидемиологический мониторинг и исследования продолжают отслеживать распространение и эволюцию hPIV во всём мире, подчёркивая их значительное влияние на общественное здоровье, особенно среди детей, где они являются одной из ведущих причин инфекций нижних дыхательных путей. Эти достижения закрепили статус hPIV как важных респираторных патогенов человека и заложили основу современных молекулярно-эпидемиологических исследований.

1.1.2 Таксономия и классификация

Вирус парагриппа человека является типичным представителем семейства *Paramyxoviridae*. Ранее классификация данного семейства основывалась преимущественно на фенотипических и биологических признаках, включая морфологические свойства, особенности организации генома и биологические функции вирусных белков. Согласно этой схеме, семейство подразделялось на два подсемейства — *Paramyxovirinae* и *Pneumovirinae* [22].

С развитием молекулярной вирусологии и широкомасштабного секвенирования таксономия парамиксовирусов была принципиально пересмотрена Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV). В настоящее время семейство *Paramyxoviridae* разделено на четыре подсемейства (*Avulavirinae*, *Rubulavirinae*, *Orthoparamyxovirinae* и *Metaparamyxovirinae*), четырнадцать родов и семьдесят восемь видов (Рисунок 1). Подсемейство *Avulavirinae* включает роды *Orthoavulavirus*, *Metaavulavirus* и *Paraavulavirus*. К подсемейству *Rubulavirinae* относятся роды *Orthorubulavirus* и *Pararubulavirus*. Подсемейство *Orthoparamyxovirinae* подразделяется на восемь родов: *Respirovirus*, *Aquaparamyxovirus*, *Henipavirus*, *Narmovirus*, *Ferlavirus*, *Morbillivirus*, *Salemvirus* и *Jeilongvirus*. В подсемействе *Metaparamyxovirinae* описан только один род — *Synodovirus* [34]. В рамках обновлённой системы вирусы парагриппа человека типов 1 (hPIV1) и 3 (hPIV3) отнесены к роду *Respirovirus* (подсемейство *Orthoparamyxovirinae*), а вирусы типов 2 (hPIV2) и 4 (hPIV4) принадлежат роду *Orthorubulavirus* (подсемейство *Rubulavirinae*) [34]. Вирус hPIV4 дополнительно подразделяется на два антигенных подтипа — hPIV4a и hPIV4b — на основании реакции торможения гемагглютинации и реактивности с моноклональными антителами [35], при этом доминирующим является подтип hPIV4a [36].

Современная классификация основана преимущественно на филогенетическом сравнении полных аминокислотных последовательностей вирусного белка L (РНК-зависимой РНК-полимеразы). Рабочая группа ICTV по *Paramyxoviridae* выбрала белок L в качестве основного таксономического критерия, поскольку этот крупный и функционально консервативный белок считается монофилетичным среди представителей семейства и, следовательно, надёжно отражает их эволюционные взаимоотношения [37,38]. Это решение стало следствием обновленной политики ICTV, допускающей классификацию вирусов исключительно на основании геномных последовательностей, включая вирусы, не выделенные в культуре [39]. В результате таксономия

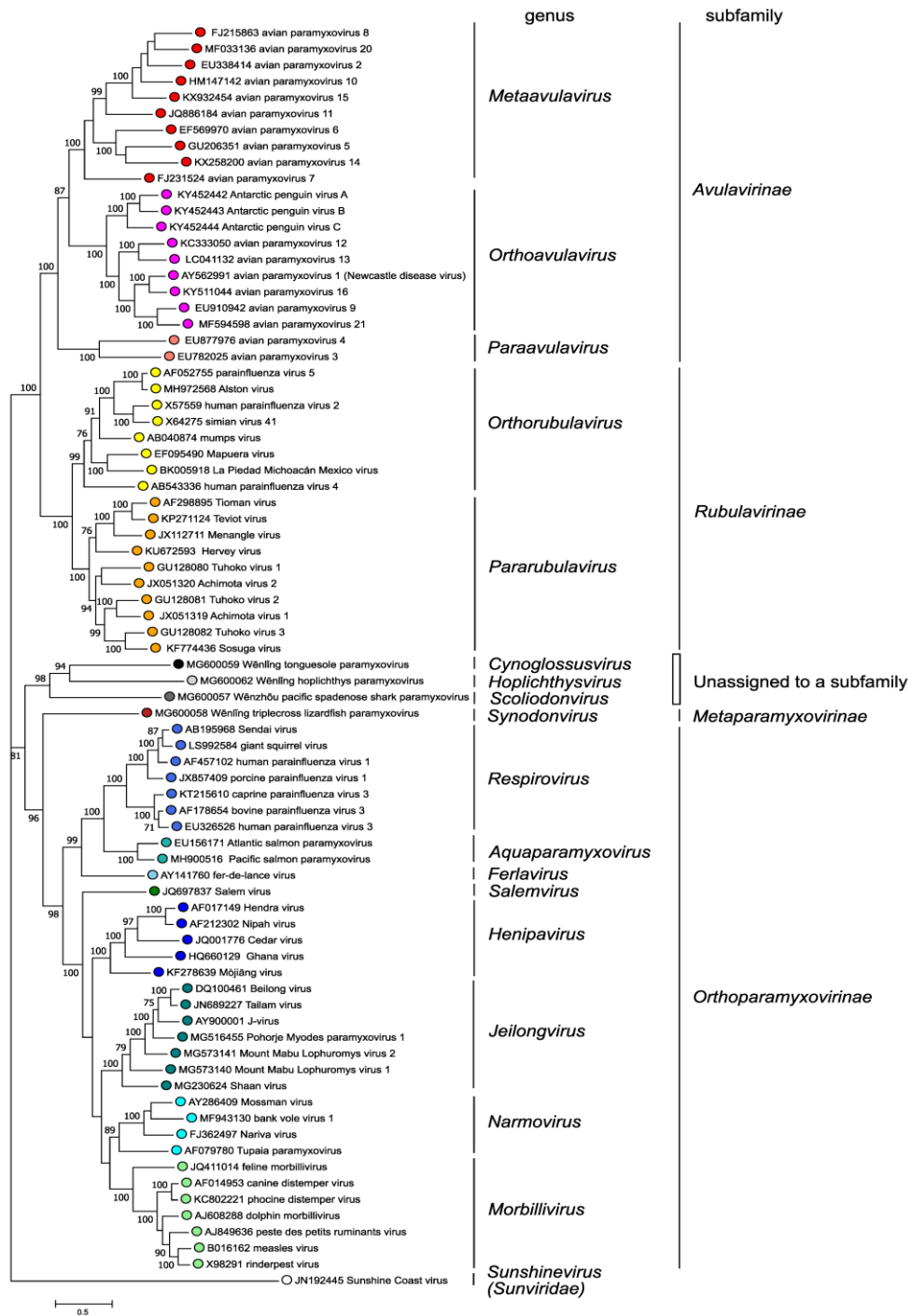


Рисунок 1. Филогенетический анализ полных аминокислотных последовательностей L-белка представителей семейства *Paramyxoviridae* [34].

1.2 Вирион и организация генома

1.2.1 Структура вириона

По данным электронной микроскопии hPIVs представляют собой плеоморфные оболочечные вирусы (Рисунок 2). Вирионы hPIV имеют средний размер от 150 до 250 нм, но были зарегистрированы и гораздо более крупные вирионы [42,43]. При проведении криоэлектронной микроскопии вирусов установлено, что вирионы имеют преимущественно идеальную сферическую форму. Неправильная форма частиц, наблюдаемая при обычной электронной микроскопии, вероятно, является артефактом, возникающим из-за этапов пробоподготовки, включающих фиксацию и дегидратацию образца [43,44].

Вирион состоит из нитевидного, окружённого липидной оболочкой со специфическими для вируса гликопротеиновыми шипами. Нуклеокапсид состоит из генома - одноцепочечной молекулы РНК отрицательной смысловой полярности, которая плотно покрыта нуклеокапсидным белком (NP) в соотношении одна молекула белка на шесть нуклеотидов. Структура нуклеокапсида также содержит два других белка - фосфопротеин (белок Р) и большой белок (белок L), которые встречаются прерывисто в виде кластеров. Исследования показали, что в вирусной частице с нуклеокапсидом связано около 300 молекул фосфопротеина (белок Р) и около 40 молекул полимеразы (белок L). В hPIV2 и hPIV4 может присутствовать дополнительный V-белок, ассоциированный с нуклеокапсидом [11]. Однако, NP является наиболее распространенным белком в вирионе, и считается, что он отвечает, вместе с белками Р и L, за РНК-зависимую активность РНК-полимеразы [22].

Вирусная оболочка содержит два вирусспецифических гликопротеина: тетрамерный белок прикрепления гемагглютинин-нейраминидазы (HN) и тримерный белок слияния (F) [45]. Белок F синтезируется в виде биологически неактивной формы-предшественника (F_0), которая расщепляется посттрансляционно клеточными протеазами с образованием активной формы из двух дисульфидно-связанных субъединиц, F_1 и F_2 [46]. Состав жирных кислот оболочки идентичен составу клеток-хозяев. Изнутри липидный бислой связан с матричным белком М. Матричный белок (М) имеет высокую гидрофобность, и его функция в вирионе заключается в посредничестве взаимодействия между гликопротеинами и нуклеокапсидом [47]. Вирусы hPIV также содержат клеточный актин в качестве структурного компонента; однако его функция в структуре вируса и репликации до конца не изучена [48].

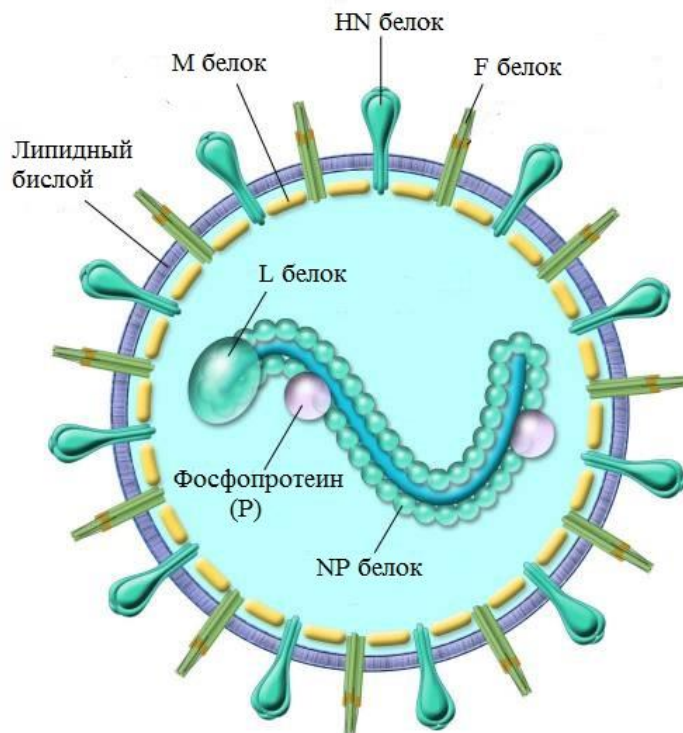


Рисунок 2. Схематическая диаграмма структуры вириона парагриппа. L — большой белок РНК-полимеразы; М — матричный белок; NP — нуклеокапсидный белок; P — фосфопротейн; HN, гемагглютинин-нейраминидаза; F — белок слияния [45].

1.2.2 Организация генома

Геном hPIV представляет собой линейную, несегментированную молекулу РНК с отрицательной полярностью, содержащую в среднем около 15 000 нуклеотидов (п.н.) [49]. Различия в длине генома между разными типами hPIV в основном обусловлены различиями в длине некодирующих последовательностей, а не существенными различиями в длине открытых рамок считывания (ОРС). Геном hPIV не имеет кэпа и поли(А)-хвоста и состоит из шести или семи генов, расположенных последовательно, кодирующих восемь или девять белков, часть которых не входит в состав вириона, но участвует в цикле репликации вируса в клетке. Геномная РНК в клетке никогда не обнаруживается в свободном виде и всегда плотно связана с белком NP [22].

Как и у других парамиксовирусов, концы генома состоят из некодирующих областей, называемых 3'-лидером и 5'-трейлером, длиной приблизительно 50 и 40 п.н. соответственно. 3'-лидерная область содержит геномный промотор, причем первые 20 нуклеотидов на 3' конце

высококонсервативны среди парамиксовирусов, что указывает на их решающую роль в иницировании транскрипции мРНК и репликации генома [50–53]. 5'-трейлерная область генома соответствует 3'-концевому участку антигена и содержит последовательности, формирующие антигенный промотор, необходимый для репликации вирусного генома. Каждый ген начинается с консервативной последовательности начала гена (GS) и заканчивается консервативной последовательностью конца гена (GE). Соседние гены разделены некодирующими межгенными последовательностями (IGS), характерными для геномов hPIV [22,34].

Организация генома вируса парагриппа — 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Рисунок 3). У представителей рода *Respirovirus* гены hPIV1 и hPIV3 разделены межгенными участками, представляющими собой консервативные тринуклеотиды (обычно 3'-GAA в геном-смысловой ориентации); у представителей рода *Rubulavirus* межгенные области hPIV2 и hPIV4 имеют неконсервативные последовательности переменной длины (от 0 до 183 п.н.) [11].

Первым геном на 3'-конце генома является ген NP. Среди различных штаммов и типов hPIV ген NP характеризуется высокой степенью консервативности, что подчеркивает его важную роль в жизненном цикле вируса [54,55]. У вируса парагриппа человека типа 3 (hPIV3) моноцистронный ген NP имеет длину приблизительно от 1 641 до 1 850 нуклеотидов. Такая вариабельность связана с естественными генетическими различиями между штаммами. Ген NP кодирует нуклеокапсидный белок длиной около 515 аминокислот [22].

Ген P использует уникальную мультицистронную стратегию кодирования, включающую непрерывные, прерывистые и перекрывающиеся цистроны. Это позволяет разделить PIV на две группы. В первой группе hPIV1 и hPIV3 кодируют белок P длиной 500–600 аминокислот из непрерывного цистрона P. Дополнительный старт-кодон внутри гена иницирует трансляцию более короткой перекрывающейся рамки считывания с образованием неструктурного белка C. Соотношение синтеза белков P и C регулируется на уровне трансляции. Белок C длиной около 204 аминокислот отсутствует в составе вириона, но обнаруживается в инфицированных клетках [56]. Вторая группа (hPIV2, hPIV4a и hPIV4b) образует несколько видов мРНК за счет редактирования мРНК гена P путём вставки двух дополнительных нетемплатных остатков G в определённой позиции, что приводит к синтезу неструктурного белка V [22]. Подобный механизм редактирования наблюдается и у других парамиксовирусов, что указывает на его широкое биологическое значение [57]. Точный механизм добавления нетемплатных нуклеотидов

неизвестен (ко- или посттранскрипционный), но, вероятно, требует вирусных белков. Белки Р и V имеют общий N-концевой участок длиной 164 аминокислоты, после чего их последовательности расходятся. Белки V содержат цистеин-обогащённый участок, аналогичный металл-связывающим доменам белков, взаимодействующих с ДНК или РНК. Этот участок консервативен среди всех генов Р парамиксовирусов, что указывает на его важную биологическую роль [58].

Ген М высоко консервативен среди hPIV и проявляет значительную гомологию, особенно в карбоксильной трети аминокислотной последовательности. Наиболее консервативные области соответствуют гидрофобным участкам, что предполагает их участие во взаимодействии с мембранами. Это подтверждает ключевую роль гена М в структурной целостности и функционировании парамиксовирусов [59,60].

Ген F имеет длину около 1845–1851 нуклеотид. Он характеризуется заметной генетической вариабельностью между штаммами hPIV и используется для дифференциации генотипов в молекулярно-эпидемиологических исследованиях. Хотя его разрешающая способность несколько ниже, чем у гена HN, совместный анализ последовательностей F и HN повышает достоверность определения линий и реконструкции эволюционных связей.

Длина гена HN у hPIV незначительно варьирует между типами и обычно составляет примерно 1700–1900 нуклеотидов в зависимости от генотипа и штамма. По сравнению с относительно консервативными генами NP и M, ген HN обладает более высоким уровнем нуклеотидной вариабельности, что отражает эволюцию под давлением иммунной системы и делает его одной из основных мишеней молекулярной эпидемиологии и филогенетического анализа. Изменчивость последовательности особенно выражена в участках, соответствующих антигенно значимым доменам, что позволило выделить генетические линии и кластеры внутри каждого типа hPIV. Несмотря на вариабельность, в последовательности сохраняются консервативные мотивы, указывающие на структурные и функциональные ограничения эволюции [4,11].

Ген L расположен на 5'-конце генома и является самым большим геном hPIV (6799 п.н.). Он представляет около 40% кодирующей емкости всего генома. Из-за длины L-гена и его расположения, число мРНК этого гена является наименьшим среди транскриптов [61].

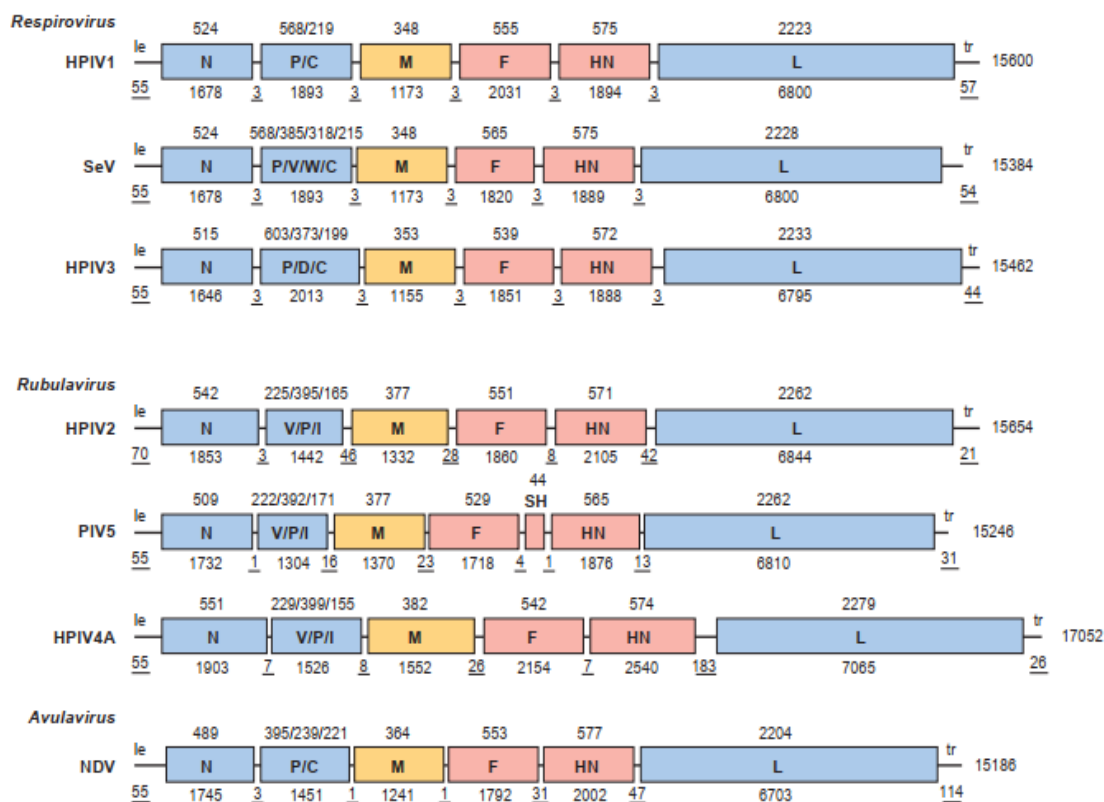


Рисунок 3. Карты генов некоторых парамиксовирусов. Каждый (-)РНК геном изображен от 3' до 5', что соответствует направлению транскрипции. Гены показаны в виде прямоугольников: те, которые кодируют ассоциированные с нуклеокапсидом и вспомогательные белки, показаны синим цветом; те, которые кодируют трансмембранные поверхностные гликопротеины, показаны красным цветом; а те, которые кодируют матричный белок внутренней оболочки, показаны коричневым цветом. Буквы внутри каждого прямоугольника обозначают кодируемый белок(и); для P и V первым показан белок, кодируемый неотредактированной информационной РНК (мРНК). Длины нуклеотидов показаны под каждой диаграммой; те, которые представляют внегенный лидер (le), концевой (tr) и межгенные области, подчеркнуты. Длины аминокислотных последовательностей показаны над диаграммами [11].

1.2.3 Вирусные белки и их антигенная структура

Все вирусы hPIV кодируют шесть общих белков: NP, P, M, F, HN и L, каждый из которых необходим для репликации вируса, и, как минимум, один дополнительный белок из гена P (С, V, D, W и I, в зависимости от вируса). Белки NP, P и L, вместе с вирусной РНК, являются необходимыми и достаточными компонентами для сборки нуклеокапсида, транскрипции и репликации РНК.

1.2.3.1 Нуклеокапсидный белок NP

Белок NP (нуклеокапсидный белок) — олигомерный, связанный с РНК конформационный белок. Его последовательность и организация высоко консервативна в семействе *Paramyxoviridae*, что делает его одним из наиболее консервативных белков hPIV [55]. Его размер варьируется среди разных вирусов от 489 до 553 аминокислот (молекулярная масса около 53-57 кДа). Он ассоциируется с геномными и антигеномными РНК, образуя высокостабильные, устойчивые к РНКазам спиральные нуклеокапсиды. Однако считается, что это не обычный РНК-связывающий белок, поскольку он несет отрицательный заряд на своей поверхности и не содержит РНК-связывающих мотивов, обычно встречающихся в клеточных РНК-связывающих белках. Принято считать, что связывание РНК белком нуклеокапсида (NP) с образованием спиральной структуры выполняет несколько критических функций. К ним относятся защита РНК от деградации нуклеазами, предотвращение отжига мРНК с комплементарной геномной РНК и выравнивание дистальной цепи РНК для формирования функционального 3'-концевого промотора. Экспрессия белков NP в отсутствие других вирусных компонентов приводит к образованию структуры, подобной нуклеокапсиду. Из этого можно сделать вывод, что белок NP обладает свойством полимеризации, и что взаимодействия N-N запускают сборку нуклеокапсида [62–64].

Нуклеокапсиды, извлеченные из разрушенных вирионов или инфицированных клеток, образуют левозакрученные, стержнеобразные спиральные структуры, имеющие вид елочки под электронным микроскопом [65,66]. При низкой концентрации соли нуклеокапсиды рыхлые и гибкие, тогда как при высокой ионной силе спирали плотные и жесткие, длиной около 1 мкм и диаметром 15–20 нм. Спираль и жесткость спирали зависят от условий среды, таких как ионная сила [67]. Среднее число субъединиц NP на один виток спирали относительно консервативно и варьирует от 12,3 до 13,4 [68–70]. 75% N-концевого нуклеокапсида является более высококонсервативной частью и участвует в образовании растворимого комплекса с P, а также в

последующем связывании с другими мономерами NP и с РНК для образования нуклеокапсида. Более вариабельная С-концевая часть молекулы, составляющая 25%, не требуется для формирования нуклеокапсида, но она необходима для его функционирования [11].

1.2.3.2 Фосфопротеин белок Р

Белок Р (фосфопротеин белок) не является высококонсервативным в пределах рода и мало консервативен между родами. Его кодирующий ген является ярким примером использования кодирующей способности вирусного генома. Как отмечено выше, этот ген способен кодировать несколько белков. Это достигается путем смещения рамки считывания в месте, где дополнительные остатки гуанина вставляются в растущую мРНК во время транскрипции.

Белок состоит из N- и С-концевых доменов, которые разделены последовательностью, содержащей сайт редактирования [71]. Белок Р является гомотетрамером [72]. Белок сильно фосфорилирован, преимущественно в N-концевой области. Эта область отвечает за связывание с субъединицами NP, тем самым обеспечивая их сохранение в качестве растворимых мономеров, что необходимо для формирования нуклеокапсида во время репликации РНК [73,74]. Домен С играет роль кофактора полимеразы и является единственным регионом, необходимым для процесса транскрипции. Этот домен опосредует связывание белка Р с нуклеокапсидом. Он также способен связывать белок L, таким образом опосредуя его связь с нуклеокапсидом [74].

1.2.3.3 Матричный белок М

Гидрофобный белок М (матричный белок) находится в тесной связи с оболочкой. Этот консервативный, негликозилированный белок составляет большую часть всех белков вириона. Димеры белка М hPIV (массой около 40 кДа) образуют решетчатую структуру на внутренней поверхности мембраны вириона [75,76].

Белок М играет важную роль в структуре вириона, опосредуя взаимодействие между ядром нуклеокапсида и поверхностными гликопротеиновыми шипами. Считается, что присоединение нуклеокапсида к гликопротеинам через белок М запускает процесс почкования вирусной частицы на плазматической мембране; это последний шаг в созревании вириона. Тесная связь белка М со структурой нуклеокапсида в инфицированных клетках предполагает, что он также может играть регуляторную роль в транскрипции и/или репликации. Тот факт, что белок М высококонсервативный среди белков hPIV, также указывает на то, что он играет важную роль в

репликации вируса [77,78]. Кроме того, предполагается, что снижение синтеза или стабильности белка М играет роль в возникновении и поддержании персистирующих инфекций [61].

1.2.3.4 Белок слияния F

F-белок всех типов hPIV представляет собой гликопротеин 1-го типа с N-концевой сигнальной последовательностью, гидрофобным трансмембранным доменом (ТМ), расположенным вблизи карбоксильного конца, и цитоплазматическим доменом (СТ) из 25–30 аминокислот [46]. Гликопротеин слияния (F) опосредует проникновение в клетку-хозяина путем слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной. На поздней стадии инфекции, когда вновь синтезированный гликопротеин F накапливается на поверхности инфицированной клетки, он также может опосредовать слияние с соседними неинфицированными клетками. Это приводит к образованию синцитиев, выраженному цитопатическому действию в монослойных культурах *in vitro*.

Белок F — типичный гликопротеин типа I с расщепляемым N-концевым гидрофобным сигнальным пептидом и C-проксимальным мембранным якорем. Белок F синтезируется как неактивный предшественник, F₀, который преобразуется в фузогенную форму путем расщепления эндопротеазой хозяина с образованием двух субъединиц: F₂, которая содержит 20% N-конца молекулы, и F₁, которая содержит остаток молекулы и закреплена в мембране. F₁ и F₂ остаются связанными дисульфидной связью. Аминоконец F₁, созданный путем расщепления, представляет собой гидрофобную область, называемую пептидом слияния, который, как полагают, вставляется в целевую мембрану для инициирования слияния. Определенные кристаллические структуры белка F вируса hPIV3 подтвердили префузионную и постфузионную конформации, характерные для белков слияния парамиксовирусов [79–81].

Прототипные штаммы большинства hPIV имеют сайты расщепления F₀, которые содержат мотив расщепления для фуриновых протеаз, включая hPIV3 и hPIV2, и эти вирусы не требуют добавления протеазы для репликации *in vitro*. С другой стороны, белки F₀ hPIV1 и hPIV4 не имеют мотива для фурина, и эти вирусы требуют добавления протеазы *in vitro*. Однако для вирусов отсутствие сайта расщепления фурином в F-белке не обязательно указывает на сниженную вирулентность; например, hPIV1 может быть высоко вирулентными *in vivo*, несмотря на отсутствие фуринового сайта расщепления.

Анализ клинических изолятов hPIV3 показал, что, хотя пять из семи изолятов содержали консенсусный мотив фурина, наблюдаемый в прототипных штаммах, два других изолята имели последовательность D-P-R-T-E-R↓ [82]. Однако эти штаммы были полностью компетентны для репликации и воспроизводства инфекционного вируса *in vitro* без добавления протеазы и не демонстрировали никаких ограничений для репликации в дыхательных путях макак-резусов. Аналогичным образом, было обнаружено, что несколько клинических изолятов hPIV2 имеют последовательность сайта расщепления T/A-T/P-R-Q-E-R↓, которая не соответствует предпочтительному мотиву фурина. В этом случае ограниченный рост этих клинических штаммов *in vitro* наблюдался в обезьяньих клетках Vero, но не в первичных культурах клеток приматов. Следовательно, наличие предпочтительного мотива расщепления фурина не является существенным для внутриклеточного расщепления или вирулентности в hPIV [11].

1.2.3.5 Гемагглютинин-нейраминидаза белок HN

hPIV HN — это гликопротеин II типа, который находится на липидной оболочке hPIV и инфицированных клеток [61]. Он обладает двойной биологической функцией: (i) активностью связывания с рецепторами (гемагглютинин), заключающейся в связывании с рецепторами сиаловой кислоты $\alpha 2,6$ или $\alpha 2,3$ на поверхности клетки-хозяина, инициируя вирусную инфекцию; и (ii) активностью фермента, разрушающего рецепторы (нейраминидаза), для эффективного высвобождения вируса путем высвобождения концевых остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты, Neu5Ac) из олигосахаридов [83–85]. Кроме того, белок HN обладает активностью, способствующей слиянию, за счет инициирования конформационных изменений в белке F, необходимых для проникновения вируса [12,13,86,87]. Двойные функции гемагглютинина/нейраминидазы HN, по-видимому, модулируются концентрацией галогенид-ионов и pH. Гемагглютинирующая активность усиливается при более высокой концентрации галогенид-ионов и более высоком pH (более щелочных условиях), что согласуется с ролью белка HN в связывании с внеклеточными рецепторами. Нейраминидазная активность оптимальна при более низком pH (более кислых условиях) и концентрации галогенид-ионов, что соответствует роли белка HN в удалении сиаловой кислоты с недавно образованных вирусных и клеточных гликопротеинов в внутриклеточных везикулах во время их транспортировки к поверхности клетки [88].

В структурном отношении, HN содержит нерасщепленную сигнальную/якорную последовательность, расположенную около N-конца. Он собирается в гомотетрамеры, каждый из которых содержит стебель, чувствительный к расщеплению трипсином, и глобулярную головку, которая представляет большую часть внеклеточного домена. Сообщалось, что глобулярная головка содержит рецептор-связывающую и нейраминидазную активности, а также все участки N-связанного гликозилирования, которые имеют решающее значение для биологических функций и антигенных свойств белка [85,89]. Несмотря на общую консервативную архитектуру, белки HN различных типов hPIV отличаются по длине аминокислотной последовательности, расположению участков N-связанного гликозилирования и ряду функционально значимых областей. Для всех типов hPIV в составе HN выделяют цитоплазматический участок, трансмембранный домен, стеблевую область и глобулярную головку (Рисунок 4), однако границы отдельных доменов и расположение функциональных сайтов могут различаться [85,90–93]. Кроме того, для некоторых типов hPIV описаны дополнительные участки, участвующие во взаимодействии белков HN и F, активации процесса слияния мембран, регуляции рецептор-связывающей активности и нейраминидазной функции [89,94,95].

Особый интерес представляет вариабельность участков N-связанного гликозилирования и отдельных функционально значимых аминокислотных остатков HN, поскольку эти изменения могут влиять на рецептор-связывающую активность, антигенные свойства вируса, эффективность активации белка F и взаимодействие вируса с иммунной системой хозяина. В связи с этим белок HN является одним из наиболее информативных молекулярных маркеров при изучении молекулярной эволюции и генетического разнообразия вирусов парагриппа человека.

1.2.3.6 Большой белок L

Белок L (большой белок) — самый крупный многодоменный белок, состоящий из пяти глобулярных доменов, соединенных между собой гибкими связующими звеньями [96]. Он отвечает за полимеризацию нуклеотидов, кэпирование РНК и метилирование [97]. N-концевой домен белка содержит высококонсервативные области, которые, как полагают, являются доменами полимеразы [98]. Комплекс L-белок–Р-белок, по-видимому, выполняет функцию РНК-полимеразы [74].

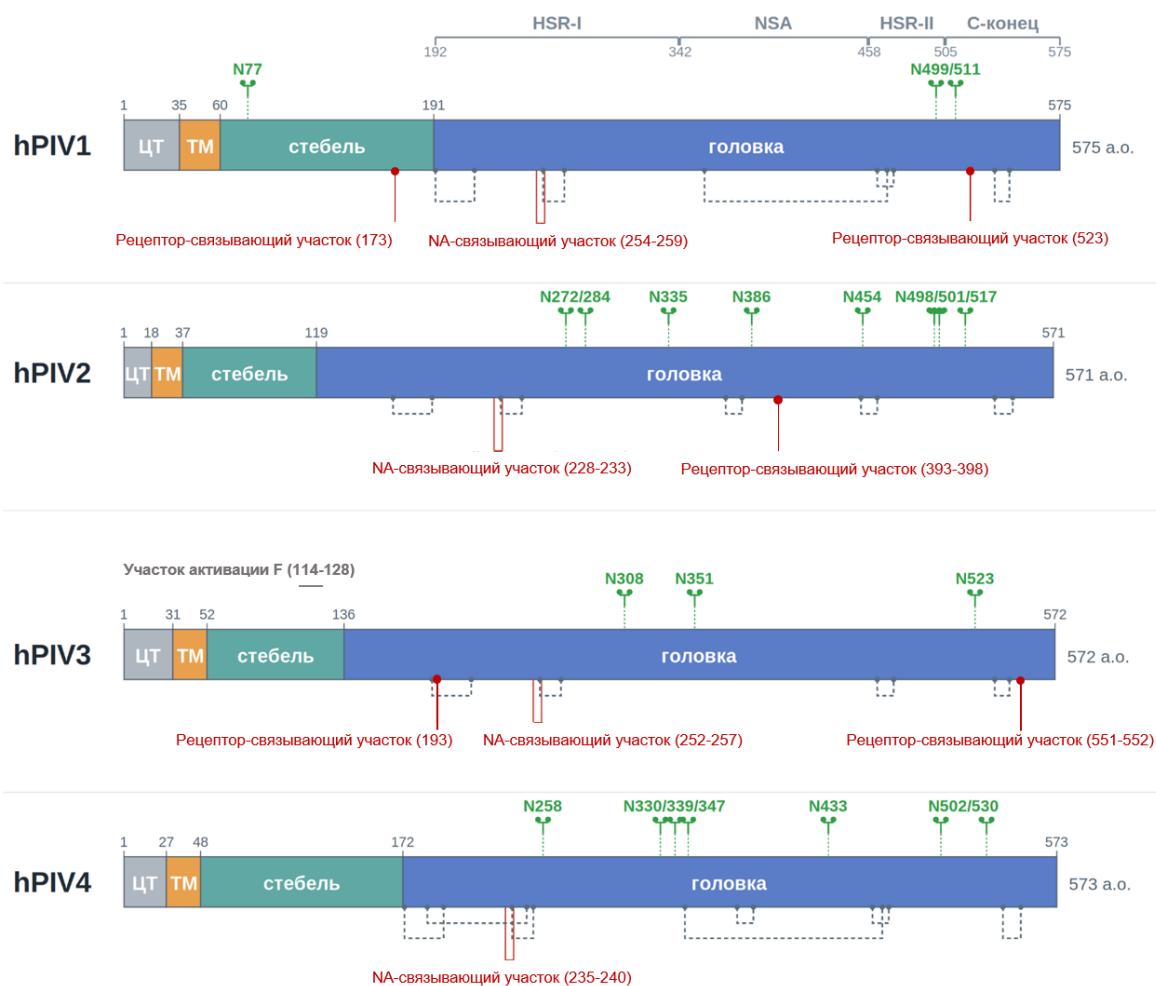


Рисунок 4. Доменная организация и функциональные участки гемагглютинин-нейраминидазы (HN) вирусов hPIV1–4. Для каждого типа показаны четыре основных домена — цитоплазматический хвост (ЦТ), трансмембранный домен (ТМ), стебель и глобулярная головка. Серыми скобками обозначены структурные области «головки» (hPIV1: HSR-I/II — области высокой структурной гомологии, NSA — область без структурного отнесения, С-конец). Зелёным показаны сайты N-гликозилирования, штриховыми скобками — дисульфидные связи, красным — нейраминидаза-связанные участки и сайты связывания рецептора. Доменные границы, сайты гликозилирования, дисульфидные связи и функциональные остатки приведены согласно аннотациям базы данных UniProt для белка HN соответствующего типа hPIV.

1.3 Молекулярная биология репликации hPIV

1.3.1 Компоненты аппарата синтеза РНК

Аппарат синтеза вирусной РНК у hPIV включает нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P) и крупный полимеразный белок (L). Нуклеопротеины состоят из структурированного домена (N_{core}), за которым следует длинный внутренне неупорядоченный хвост (N_{tail}). Домен N_{core} отвечает за олигомеризацию на РНК и формирует основную часть нуклеокапсида, тогда как N_{tail} обеспечивает рекрутирование полимеразного комплекса. Нуклеопротеины способны к самосборке на геноме благодаря сродству к РНК и взаимодействиям между соседними протомерами [55].

Белок L обладает всеми ферментативными активностями, необходимыми для транскрипции и репликации генома: синтез РНК, добавление кэпа к мРНК, метилирование гуанина по положению N-7 в структуре кэпа и 2'-O-метилирование рибозы первого нуклеотида. Полиаденилирование мРНК происходит вследствие «заикания» полимеразы на короткой последовательности poly(U), расположенной в сигнале полиаденилирования [97,99,100].

Фосфопротеин выполняет несколько важных функций: стабилизирует белок L, рекрутирует его к матрице, поддерживает белок NP в мономерном состоянии, свободном от РНК, и обеспечивает доставку NP-белков для инкапсидации вновь синтезируемой РНК во время репликации [55]. Хотя аминокислотная последовательность фосфопротеина слабо консервативна, его организация в виде трёх модулей, соединённых длинными неупорядоченными участками, сохраняется в пределах порядка вирусов [101]. N-концевой домен (PNTD) связывает нуклеопротеин и предотвращает его самосборку на РНК, отличных от вирусных геномов и антигеномов. Это взаимодействие формирует комплекс NP0-P, используемый как субстрат для инкапсидации вновь синтезируемой РНК при репликации генома. Центральный домен, или домен олигомеризации (POD), образует длинный параллельный тетрамер типа «coiled-coil» [102]. C-концевой домен, или X-домен (PXD), взаимодействует с нуклеопротеином и рекрутирует полимеразу на нуклеокапсид [103].

1.3.2 Транскрипция и репликация генома

Репликация РНК-вирусов происходит в цитоплазме клетки-хозяина, и зрелые вирусные частицы высвобождаются путем почкования через плазматическую мембрану. Первым шагом в

цикле инфекции является присоединение вирусной частицы к ее клеточному рецептору, процесс, опосредованный гликопротеином HN в hPIV. Белок F катализирует последующее слияние оболочки вируса и клеточной мембраны. После слияния оболочки с мембраной клетки нуклеокапсидная структура, содержащая геном, высвобождается в цитоплазму. Геном РНК-вирусов с отрицательной полярностью не может функционировать напрямую как мРНК, но сначала должен быть транскрибирован в вирус-специфические виды мРНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы. Поскольку эукариотические клетки не содержат этого фермента, РНК-полимераза у (-)РНК вирусов содержится в вирионе. Для этой активности необходимы вирусные белки Р и L, а также, возможно, NP. Во время первичной транскрипции геномная РНК последовательно транскрибируется, начиная с 3'-конца генома, для получения отдельных видов мРНК. Полимераза имеет единственный участок прикрепления к геномной РНК и копирует вирусные гены один за другим [104]. На границах генов транскриптаза переходит к следующему гену, не копируя короткие межгенные последовательности, и на каждом из соединений генов эффективность транскрипции снижается. Молекулы вирусной мРНК модифицируются, чтобы содержать метилированную кэп-структуру на 5'-конце и полиаденилированный 3'-конец, напоминающий эукариотические мессенджеры. Впоследствии мРНК транслируются в полноразмерные белки на рибосомах клетки-хозяина, за исключением белка F, который синтезируется как предшественник (F_0) и позже расщепляется до своей активной формы (F_1F_2) протеолитическими ферментами клетки-хозяина. Протеолитическое расщепление неактивного белка-предшественника F_0 важно для инфекционности вируса, поскольку клетки, лишенные этой активности, не способны поддерживать репликацию вируса. Таким образом, протеолитическая активация является определяющим фактором для тканевого тропизма и патогенеза hPIV. Гликопротеины подвергаются обработке (например, гликозилированию, присоединению жирных кислот) в ходе сложного процесса их транспортировки через комплекс Гольджи к плазматической мембране [105].

Репликация генома происходит в два этапа. Сначала РНК с отрицательной цепью копируется в комплементарную РНК с положительной цепью, а затем эта молекула функционирует как шаблон для синтеза геномной РНК. При репликации генома полимеразы должны игнорировать сигналы остановки транскрипции на границах генов, чтобы создать полноразмерную геномную РНК. На основе исследований с вирусом Сендай было высказано

предположение, что концентрация NP регулирует активность полимеразы, причем избыток благоприятствует производству полноразмерных копий генома с помощью механизма считывания репликазы. С другой стороны, дефицит NP благоприятствует производству моноцистронных мРНК [61]. Рисунок 5 представляет собой схематическую модель генома hPIV и его репликативный цикл.

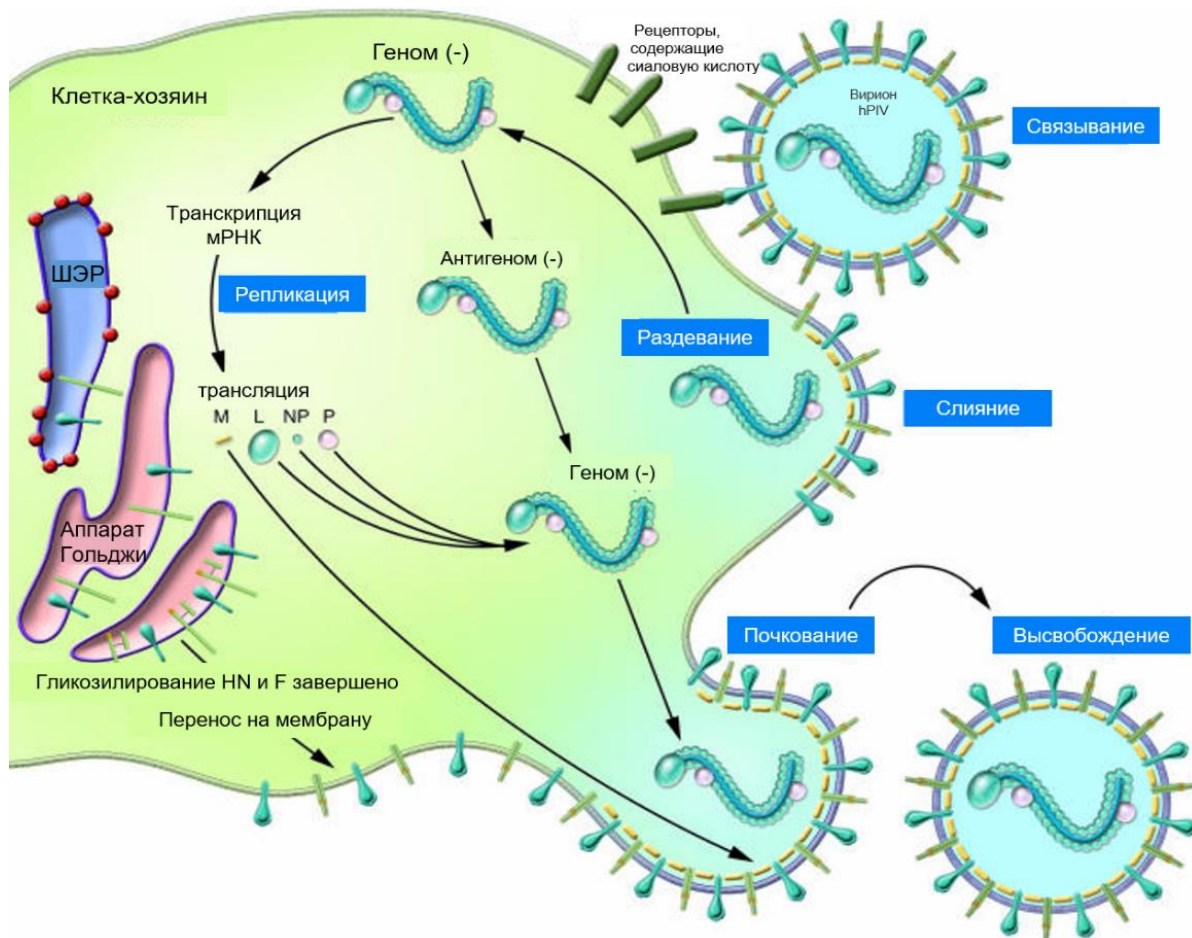


Рисунок 5. Схематическое изображение жизненного цикла вируса парагриппа человека. Транскрипция вирусных генов и репликация генома происходят в цитоплазме клетки. После синтеза вирусные структурные белки и рибонуклеопротеиновые комплексы транспортируются к плазматической мембране инфицированной клетки, где происходит сборка и отпочковывание вирусных частиц [45].

1.4 Эпидемиология и клинические проявления вирусов парагриппа человека

Вирусы парагриппа человека являются важными ведущими причинами инфекций верхних и нижних дыхательных путей, вызывая широкий спектр клинических заболеваний, от обычной простуды до тяжелых заболеваний нижних дыхательных путей, таких как пневмония и бронхиолит [106,107]. Передача осуществляется при непосредственном контакте между людьми или посредством крупных капель аэрозоля и после заноса вируса быстро распространяется в детских дошкольных учреждениях, семьях и организованных коллективах [108].

Сезонность различных типов hPIV имеет географические особенности. Инфекции, вызванные hPIV1 и hPIV2, чаще выявляются в осенний сезон. В то время как в течение многих лет hPIV3 характеризовался эндемичным типом циркуляции с регистрацией случаев инфекции в течение всего года, за последние 15 лет отмечен переход к ежегодным эпидемическим подъемам заболеваемости hPIV3 весной и в начале лета [106,109–111]. Сезонные закономерности hPIV4 изучены недостаточно, имеется лишь несколько сообщений о небольшом количестве вирусов, выделенных от детей и взрослых [112,113].

Установлено, что заболеваемость, вызванная hPIV3, является наиболее распространенным среди всех типов hPIV и также связана с тяжелыми клиническими проявлениями [109,114,115]. hPIV3 занимает второе место после респираторно-синцитиального вируса человека по частоте тяжелых заболеваний дыхательных путей у детей младше 5 лет [116–119]. Ряд эпидемиологических исследований продемонстрировал преобладание hPIV3 в этой группе пациентов. Так, ретроспективный анализ, проведенный в Великобритании в период с 1998 по 2013 гг., показал, что на hPIV3 приходилось 68,3% всех зарегистрированных случаев заболеваний дыхательных путей у детей младше 5 лет [120]. Аналогично, в эпидемиологическом исследовании, описывающем закономерности циркуляции hPIV в США с 2011 по 2019 гг., было установлено, что доля hPIV3 составила 55% всех случаев инфекции парагриппа [121]. По распространенности после hPIV3 следуют hPIV1 и hPIV2, занимая второе и третье места, соответственно [36,122]. В отличие от них, hPIV4 остается значительно менее изученным и привлекает сравнительно ограниченное внимание исследователей. Это в первую очередь связано с более низкой частотой его выявления по сравнению с другими типами hPIV, а также с методическими и диагностическими трудностями, связанными с его идентификацией и культивированием [112,123,124].

Инфицирование hPIV обычно происходит в раннем детском возрасте. Серологические исследования показывают, что не менее 60% детей инфицируются hPIV3 к 2-летнему возрасту и около 80% — к 4 годам [125,126]. В продольном когортном исследовании Glezen и соавт. установили, что по крайней мере две трети детей переносят инфекцию hPIV3 в течение первых двух лет жизни, что свидетельствует о высокой заболеваемости в раннем детстве [127]. Серологические данные также показывают, что уровень серопозитивности к hPIV1 и hPIV2 увеличивается с возрастом и более заметно возрастает у детей старше пяти лет, что указывает на частое приобретение инфекции этими типами в дошкольном и младшем школьном возрасте [125,128].

Клинические проявления инфекции, вызванной hPIV, варьируются от легких заболеваний верхних дыхательных путей до тяжелой пневмонии [129,130]. Сезонные эпидемические заболеваемости hPIV создают значительное бремя болезни у детей и, по оценкам, обуславливают 40% госпитализаций по поводу инфекций нижних дыхательных путей в детском возрасте и 75% случаев крупа [131]. При этом каждый тип характеризуется определенными клиническими особенностями. hPIV1 и hPIV2 являются основными возбудителями крупа, вызывая 60–75% всех случаев заболевания. Круп, обусловленный hPIV2, как правило, протекает легче, однако может приводить к выраженной обструкции дыхательных путей и госпитализации [132,133]. В отличие от этого, инфекции нижних дыхательных путей, такие как бронхолит и пневмония, часто наблюдаются у детей раннего возраста при инфекции hPIV3 [134]. В Соединенных Штатах ежегодно около 18 000 младенцев и детей госпитализируются с инфекциями нижних дыхательных путей, вызванными hPIV3 [4]. hPIV4 традиционно считался менее клинически значимым, поскольку преимущественно ассоциировался с легкими формами заболевания [135,136]. Однако недавние исследования показали, что он может вызывать инфекции нижних дыхательных путей, включая пневмонию и бронхолит, у детей и лиц пожилого возраста [137–139], а также у иммунокомпрометированных пациентов [140,141]. Кроме того, описаны локальные вспышки инфекции, обусловленные hPIV4 [142,143]. Иммунитет к hPIV не является пожизненным, и повторные инфекции возможны на протяжении всей жизни. Тем не менее у здоровых детей старшего возраста и взрослых заболевание обычно ограничивается инфекциями верхних дыхательных путей, тогда как инфекции нижних дыхательных путей, связанные с реинфекцией, встречаются редко [4,127].

Несмотря на то, что летальность при инфекциях, вызванных hPIV, в целом остаётся низкой, hPIV3 способен вызывать тяжёлые и даже смертельные заболевания, особенно у младенцев раннего возраста и других уязвимых групп пациентов. В одном опубликованном случае описан доношенный новорожденный, у которого развился вирусный сепсис и септический шок из-за вируса hPIV3, и который умер, несмотря на интенсивную терапию, без обнаружения сопутствующей инфекции [144]. Кроме того, в другом исследовании описан летальный случай ларинготрахеита, подтвержденного hPIV1, без признаков бактериальной суперинфекции, у 15-месячного ребенка [145].

1.5 Подходы к секвенированию вирусов парагриппа человека

1.5.1 Ранние подходы к молекулярному анализу hPIV

Первые молекулярно-генетические исследования вирусов парагриппа человека преимущественно основывались на классическом секвенировании по Сэнгеру отдельных участков вирусного генома. В связи с ограниченной пропускной способностью и высокой трудоёмкостью ранних технологий секвенирования большинство исследований было сосредоточено на анализе частичных геномных регионов, а не полных геномов вируса. Среди них наиболее часто используемой молекулярной мишенью стал ген гемагглютинин–нейраминидазы, поскольку он кодирует один из основных поверхностных гликопротеинов hPIV и играет ключевую роль в прикреплении вируса к клеткам хозяина и высвобождении дочерних вирионов. Кроме того, ген HN характеризуется относительно высокой генетической вариабельностью, что делает его особенно подходящим для молекулярно-эпидемиологических и филогенетических исследований [92,146].

В результате секвенирование гена HN по Сэнгеру стало основой большинства ранних молекулярно-эпидемиологических исследований hPIV [147,148]. Первоначальные исследования были в основном направлены на характеристику циркулирующих вирусных вариантов в отдельных географических регионах и оценку их генетического разнообразия. Так, Mizuta и соавт. выполнили детальный филогенетический анализ изолятов hPIV1, полученных от пациентов с острыми респираторными инфекциями в Японии, с использованием секвенирования гена HN по Сэнгеру и выделили два основных генетических кластера 1 и 2 [149]. Впоследствии аналогичные подходы были применены и к другим типам hPIV. Almajhdi и соавт. амплифицировали ген HN

штамма hPIV2 Riyadh 105/2009 с использованием трёх перекрывающихся пар праймеров с последующим двунаправленным секвенированием по Сэнгеру (GenArt, Regensburg, Германия) [150]. Аналогично, Park и соавт. сообщили о первом генетическом анализе hPIV1, hPIV2 и hPIV3, циркулирующих в Корее, при котором полноразмерные последовательности гена HN амплифицировались с помощью ОТ-ПЦР и секвенировались для последующего филогенетического анализа [151]. В случае hPIV4 анализ последовательностей HN также использовался для подтверждения разделения вируса на два антигенных подтипа — hPIV4a и hPIV4b [152]. В совокупности данные исследования впервые продемонстрировали генетическую неоднородность циркулирующих вариантов hPIV, позволили анализировать их географическое распространение и оценивать временные особенности циркуляции вируса. Однако большинство исследований ограничивалось относительно короткими геномными участками и, следовательно, отражало лишь часть общего генетического разнообразия вируса.

Помимо гена HN, в ряде исследований также применялось секвенирование гена белка слияния (F), кодирующего другой основной поверхностный гликопротеин, участвующий в слиянии вирусной оболочки с клеточной мембраной и проникновении вируса в клетки хозяина. По сравнению с геном HN ген F обычно считается более консервативным, что в ряде случаев ограничивало его филогенетическое разрешение при различении близкородственных вирусных вариантов. Тем не менее секвенирование гена F предоставляло дополнительную информацию об эволюции вируса и его молекулярных характеристиках и часто использовалось в сочетании с анализом HN-гена. Например, Terrier и соавт. амплифицировали и секвенировали полные последовательности генов F и HN изолятов hPIV2 [153], тогда как Santak и соавт. анализировали оба гена — HN и F — для изучения молекулярных характеристик штаммов hPIV2, циркулирующих в Хорватии [154]. Аналогично, Komada и соавт. клонировали и секвенировали кДНК, кодирующие белки слияния hPIV4a и hPIV4b, с использованием метки [α -³⁵S]dATP и подтвердили разделение вирусов hPIV4 на две генетически различные группы [155].

Подходы, основанные на секвенировании по Сэнгеру, были ограничены относительно низкой пропускной способностью метода, что ограничивало количество образцов и геномных регионов, которые могли быть одновременно проанализированы. Тем не менее именно эти ранние исследования заложили основу современных представлений о генетическом разнообразии hPIV и

подготовили переход к технологиям секвенирования нового поколения и полногеномной характеристике вирусов парагриппа человека.

1.5.2 Высокопроизводительное и полногеномное секвенирование hPIV

Внедрение технологий секвенирования нового поколения (NGS) существенно расширило возможности молекулярного анализа респираторных вирусов, включая вирусы парагриппа человека. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, технологии NGS обеспечивают значительно более высокую пропускную способность, позволяют одновременно анализировать большое количество образцов и геномных фрагментов, а также получать существенно большую глубину покрытия вирусных геномов [156,157]. Кроме того, внедрение мультиплексных стратегий подготовки библиотек сделало возможным параллельное секвенирование множества вирусных образцов в рамках одного запуска, что значительно повысило эффективность молекулярно-эпидемиологических исследований.

На ранних этапах внедрения технологий NGS в исследования hPIV подходы к секвенированию по-прежнему частично были сосредоточены на анализе отдельных геномных участков, прежде всего генов HN и F, благодаря их высокой филогенетической информативности и широкому использованию в предыдущих молекулярно-эпидемиологических исследованиях. Так, Shao и соавт. с применением технологии секвенирования нового поколения исследовали только гены HN и F для молекулярного анализа hPIV с целью установления их филогенетических связей [17].

Тем не менее растущая доступность и высокая пропускная способность технологий NGS постепенно обеспечили переход от секвенирования отдельных генов к полногеномному секвенированию (WGS) hPIV. Получение полных или практически полных геномов вируса обеспечивало существенно более высокое филогенетическое разрешение по сравнению с анализом отдельных генов, поскольку позволяло учитывать генетическую вариабельность по всему геному вируса и улучшало дифференциацию близкородственных вирусных штаммов [158].

Одним из первых крупномасштабных исследований, основанных на полногеномном анализе hPIV, стала работа Vose и соавт., в которой были секвенированы и проанализированы геномы hPIV1 и hPIV3, полученные из различных географических регионов мира, включая Аргентину, Австралию, Францию, Мексику, Южную Африку, Швейцарию и США [19]. В данном исследовании авторы использовали несколько платформ секвенирования нового поколения. Для

восстановления вирусных геномов применяли амплификацию генома перекрывающимися фрагментами с последующей независимой от последовательности амплификацией с одним праймером (SISPA) и высокопроизводительным секвенированием. В итоге авторы получили 40 геномных последовательностей hPIV1 и 75 последовательностей hPIV3, включая 21 полный геном hPIV1 и 51 полный геном hPIV3, из образцов, собранных в течение нескольких эпидемических сезонов. Исследование продемонстрировало возрастающее значение полногеномного секвенирования для молекулярно-эпидемиологического надзора и эволюционного анализа вирусов парагриппа человека [19].

Другим примером раннего применения полногеномного секвенирования hPIV стала работа Phan и соавт., в которой были получены первые полные геномные последовательности изолятов hPIV1, hPIV2, hPIV3 и hPIV4 из Нидерландов [159]. В данном исследовании респираторные образцы, собранные в период с 2013 по 2016 год, предварительно культивировали на клеточной линии LLC-MK2. Вирусную РНК, выделенную из культуральных супернатантов, подвергали обратной транскрипции с использованием случайных гексамерных праймеров с последующим синтезом второй цепи и подготовкой библиотек для полногеномного секвенирования. Используя секвенирование нового поколения со случайным праймированием и сборку геномов *de novo*, авторы успешно реконструировали восемь полных геномов hPIV, представляющих все четыре типа вируса. Данное исследование дополнительно продемонстрировало применимость технологий NGS для получения полных геномов hPIV и внесло вклад в расширение доступных полногеномных референсных последовательностей для глобального сравнительного анализа вирусов парагриппа человека [159].

Более позднее исследование Goya и соавт. является одним из крупнейших геномных исследований hPIV2 и hPIV4 на сегодняшний день [160]. Авторы получили 101 геномную последовательность вируса из респираторных образцов, собранных в западной части штата Вашингтон. Данное исследование существенно расширило количество публично доступных полногеномных последовательностей hPIV2 и hPIV4 и продемонстрировало растущее применение высокопроизводительных технологий секвенирования для масштабной геномной характеристики и эволюционного анализа вирусов парагриппа человека [160].

Таким образом, внедрение технологий NGS и развитие полногеномного секвенирования существенно расширили возможности молекулярной эпидемиологии hPIV, обеспечив переход от

анализа отдельных геномных участков к исследованию полных вирусных геномов. Дальнейшее развитие данных технологий сопровождалось разработкой различных подходов к восстановлению вирусных геномов, включая таргетные ампликонные методы секвенирования непосредственно из клинического материала.

1.5.3 Ампликонные подходы к полногеномному секвенированию

Ампликонные подходы к полногеномному секвенированию были разработаны для повышения эффективности восстановления вирусных геномов непосредственно из клинического материала, особенно для РНК-вирусов, характеризующихся относительно низкой вирусной нагрузкой и высоким содержанием нуклеиновых кислот хозяина. Принцип данного подхода основан на мультиплексной ПЦР-амплификации множества перекрывающихся геномных фрагментов с использованием специально разработанных панелей праймеров, покрывающих весь вирусный геном. После амплификации объединённые ампликоны подвергаются секвенированию нового поколения с последующей сборкой генома. Использование перекрывающихся ампликонов позволяет получать полные вирусные геномы при одновременном снижении доли невирусных нуклеиновых кислот в секвенируемых библиотеках [161].

Современные стратегии ампликонного секвенирования с использованием перекрывающихся ампликонов получили значительное развитие благодаря работе Quick и соавт., разработавших мультиплексный ПЦР-подход для секвенирования геномов вирусов Зика и Эбола с использованием схем перекрывающихся праймеров, созданных при помощи программной платформы PrimalScheme [162]. Авторы показали, что мультиплексное секвенирование с использованием перекрывающихся ампликонов обеспечивает быстрое, чувствительное и масштабируемое восстановление вирусных геномов непосредственно из клинических образцов и может эффективно сочетаться с высокопроизводительными платформами секвенирования.

Впоследствии секвенирование с использованием перекрывающихся ампликонов получило широкое распространение в период пандемии SARS-CoV-2 благодаря внедрению стандартизированных протоколов сети ARTIC, обеспечивших проведение масштабного геномного надзора за SARS-CoV-2 во всём мире. Успешность применения праймерных панелей для полногеномной амплификации SARS-CoV-2 сделала ампликонное секвенирование одним из основных методов геномного мониторинга РНК-вирусов [163,164].

Массовое секвенирование SARS-CoV-2 впоследствии стимулировало адаптацию аналогичных подходов для геномного надзора за другими респираторными РНК-вирусами, включая респираторно-синцитиальный вирус (hRSV) и метапневмовирус человека (hMPV) [165,166]. Однако по сравнению с ними применение ампликонных подходов к полногеномному секвенированию hPIV оставалось относительно ограниченным, и к настоящему времени описано лишь небольшое число специально разработанных праймерных панелей.

Одно из первых исследований, в котором ампликонный подход к полногеномному секвенированию был применён для hPIV, было выполнено Smielewska и соавт., разработавшими панель для амплификации на основе перекрывающихся ампликонов для анализа циркулирующих штаммов hPIV3 в Великобритании [21]. Исследование включало респираторные образцы, собранные в период с 2011 по 2015 год, и представляло собой первую полногеномную характеристику циркулирующих британских штаммов hPIV3. Для амплификации генома авторы разработали панель из двенадцати перекрывающихся пар праймеров, покрывающих полный геном hPIV3. Амплификация проводилась с использованием одношаговой ОТ-ПЦР с последующим секвенированием объединённых ампликонов на платформе Illumina MiSeq и дальнейшей сборкой геномов с использованием специализированного биоинформатического пайплайна. С помощью данного подхода авторам удалось получить двадцать полных геномных последовательностей hPIV3 из клинических штаммов, предварительно накопленных в культуре клеток. Глубина покрытия оставалась стабильно высокой на большей части генома, тогда как снижение покрытия наблюдалось преимущественно на 5'- и 3'-концевых участках генома. Работа продемонстрировала применимость ампликонного секвенирования для восстановления полных геномов hPIV и показала его перспективность для геномного надзора за циркулирующими респираторными вирусами на протяжении нескольких эпидемических сезонов [21].

В более позднем исследовании ампликонный подход к полногеномному секвенированию был применён к существенно более крупному набору клинических образцов hPIV1–4, полученных от госпитализированных детей с острыми инфекциями нижних дыхательных путей в шести регионах Китая в период с 2015 по 2021 год [18]. В данной работе вирусные геномы обогащались с использованием набора для обогащения геномов hPIV, основанного на перекрывающихся ПЦР-ампликонах, с последующим секвенированием на платформе Illumina MiSeq. Использование данного подхода позволило получить 156 полных геномных последовательностей hPIV

непосредственно из клинического материала, включая 45 геномов hPIV1, 9 — hPIV2, 101 — hPIV3 и 1 геном hPIV4b. Несмотря на то что основное внимание в исследовании уделялось последующему генетическому и эволюционному анализу, работа продемонстрировала возможность применения ампликонного подхода с обогащением для полногеномного восстановления различных типов hPIV в крупных коллекциях клинических образцов [18].

Более позднее исследование, посвящённое геномному надзору за hPIV2, циркулировавшим на юге Франции в период 2017–2022 годов, также было выполнено с использованием ампликонного подхода к полногеномному секвенированию [20]. Перед проведением секвенирования нового поколения был реализован собственный подход, основанный на ПЦР-обогащении с использованием праймеров, разработанных при помощи PrimalScheme, после чего проводилось секвенирование на платформе Illumina NovaSeq и реконструкция геномов с использованием картирования на референсный геном и сборки de novo. С применением данной стратегии из 318 респираторных образцов, положительных по hPIV2, было получено 77 полных геномов с покрытием $\geq 90\%$ и дополнительно 239 геномов с покрытием $\geq 70\%$. Это исследование существенно увеличило количество доступных геномных последовательностей hPIV2 и продемонстрировало применимость ампликонных подходов для масштабного геномного надзора за циркулирующими штаммами hPIV [20].

Несмотря на высокую чувствительность и пригодность для масштабного геномного надзора, ампликонные подходы к полногеномному секвенированию обладают рядом методологических ограничений, которые необходимо учитывать при интерпретации результатов секвенирования. Одной из основных проблем является зависимость эффективности амплификации от степени комплементарности между праймерами и вирусными геномными последовательностями. Поскольку стратегии, основанные на перекрывающихся ампликонах, предполагают одновременную амплификацию множества перекрывающихся геномных фрагментов, мутации, возникающие в участках связывания праймеров, могут снижать эффективность амплификации или приводить к полному выпадению отдельных ампликонов, что, в свою очередь, вызывает неравномерность покрытия генома и неполное восстановление геномных последовательностей [162]. Подобные эффекты особенно важны для РНК-вирусов, характеризующихся постоянной генетической эволюцией и накоплением нуклеотидных замен с течением времени.

Другим важным ограничением ампликонного секвенирования является выраженная зависимость эффективности восстановления генома от вирусной нагрузки в клиническом материале. Для эффективного получения полных вирусных геномов обычно требуется достаточная концентрация вирусной РНК, которая, как правило, оценивается по значениям порогового цикла (Ct), определяемым при проведении ОТ-ПЦР в реальном времени. Образцы с высокими значениями Ct часто приводят к получению неполных геномных сборок, снижению глубины секвенирования или отсутствию амплификации отдельных ампликонов [162]. Кроме того, снижение покрытия нередко наблюдается в области 5'- и 3'-концевых участков вирусных геномов, что может быть связано как с техническими трудностями амплификации терминальных участков генома, так и с более низкой эффективностью амплификации терминальных ампликонов. Так, Smielewska и соавт. при проведении ампликонного полногеномного секвенирования штаммов hPIV3, циркулировавших в Великобритании, продемонстрировали стабильно высокую глубину покрытия на большей части генома, однако отметили снижение покрытия вблизи терминальных участков генома [21]. В связи с этим исследования, использующие ампликонные подходы к секвенированию, часто применяют критерии отбора образцов на основе значений Ct до подготовки библиотек для NGS. Например, Zhu и соавт. проводили полногеномное секвенирование только для образцов, положительных по hPIV и имеющих значения Ct ниже 28, что позволило получать полные геномы с высокой глубиной покрытия непосредственно из клинического материала [18]. Аналогичная зависимость эффективности восстановления генома от значений Ct была также описана для ампликонных подходов, разработанных для других респираторных РНК-вирусов, включая SARS-CoV-2 и hRSV [163,167].

Тем не менее, несмотря на указанные ограничения, ампликонные подходы к секвенированию остаются одними из наиболее чувствительных и широко используемых методов восстановления полных вирусных геномов непосредственно из клинического материала.

1.5.4 Метагеномные подходы к полногеномному секвенированию

Альтернативой таргетным ампликонным стратегиям секвенирования являются метагеномные и независимые от последовательности подходы к секвенированию, не требующие использования вирус-специфичных праймеров. В отличие от ампликонного секвенирования, основанного на применении заранее разработанных панелей праймеров, нацеленных на определённые участки генома, данные методы используют случайное праймирование в процессе синтеза кДНК и

обеспечивают последующее секвенирование вирусных нуклеиновых кислот без предварительного таргетного обогащения конкретного вирусного генома. Такие подходы особенно полезны для характеристики генетически разнообразных или недостаточно изученных вирусов, а также в ситуациях, когда доступная предварительная геномная информация ограничена [168,169].

Одним из наиболее широко используемых независимых от последовательности подходов является SISPA (независимая от последовательности амплификация с одним праймером), основанный на случайном праймировании с последующей универсальной ПЦР-амплификацией. В классическом протоколе SISPA во время синтеза кДНК используются случайные праймеры, содержащие известную адаптерную последовательность, что позволяет проводить последующую амплификацию с использованием единственного универсального праймера, комплементарного адаптерному участку [170,171]. Данная стратегия успешно применялась для секвенирования различных РНК-вирусов, включая hPIV. Так, Bose и соавт. в ходе масштабных полногеномных исследований hPIV1 и hPIV3 использовали SISPA для восстановления вирусных геномов из клинических образцов и вирусных изолятов [19]. С использованием данной стратегии авторами было получено множество полных геномов hPIV1 и hPIV3, что существенно расширило количество общедоступных полногеномных последовательностей этих вирусов [19].

Важным этапом развития независимого от последовательности секвенирования стало появление подходов, основанных на механизме переключения матрицы, включая методы семейства SMART (переключение матрицы на 5'-конце РНК). Исходная технология SMART, описанная Zhu и соавт., первоначально была разработана для создания полноразмерных библиотек кДНК и основывалась на активности переключения матрицы обратной транскриптазы, производной от MMLV [172]. В процессе обратной транскрипции после достижения 5'-конца РНК-матрицы обратная транскриптаза добавляет несколько нематричных остатков цитозина к 3'-концу вновь синтезированной цепи кДНК. После этого олигонуклеотид переключения матрицы, содержащий концевые рибогуанозины, гибридизуется с данным обогащённым dC участком и служит дополнительной матрицей для продолжения синтеза кДНК, что приводит к включению определённой адаптерной последовательности на конце молекулы кДНК. В результате формируются полноразмерные молекулы кДНК, содержащие известные адаптерные последовательности на обоих концах, которые впоследствии могут быть амплифицированы с использованием универсальных праймеров. Поскольку переключение матрицы наиболее

эффективно происходит при достижении обратной транскриптазой конца РНК-матрицы, укороченные продукты кДНК амплифицируются менее эффективно, что способствует обогащению конечной библиотеки полноразмерными последовательностями [172].

Дальнейшее развитие данной стратегии привело к созданию модифицированных SMART-подходов, использующих случайное праймирование вместо oligo(dT)-праймирования, включая SMART-9N. В данном подходе синтез кДНК инициируется праймерами, содержащими случайные нонамерные последовательности (из девяти нуклеотидов), что обеспечивает независимую от последовательности амплификацию вирусной РНК без предварительной информации о структуре вирусного генома и без необходимости использования вирус-специфичных праймеров. Clago и соавт. адаптировали протоколы SMART-9N и Rapid SMART-9N для нанопорового метагеномного секвенирования РНК-вирусов из вирусных изолятов и клинических образцов [173]. В отличие от классических SISPA-подходов, при которых адаптерные последовательности вводятся во время синтеза второй цепи, в SMART-9N адаптерные последовательности включаются уже на этапе обратной транскрипции посредством переключения матрицы. Авторы показали, что данные подходы обеспечивали восстановление полных вирусных геномов вируса Зика, вируса жёлтой лихорадки и SARS-CoV-2 в образцах с широким диапазоном Ct-значений, а также позволяли получать длинные прочтения длиной до 18,5 т.п.н. при нанопоровом секвенировании. Кроме того, модификация Rapid SMART-9N позволила сократить время подготовки библиотек и снизить стоимость секвенирования по сравнению со стандартными мультиплексными ампликонными протоколами [173].

Несмотря на свою широкую применимость, метагеномные подходы, включая стратегии независимой от последовательности амплификации, имеют ряд существенных ограничений, отличающих их от таргетного ампликонного секвенирования. Основным ограничением является высокая доля невирусных фоновых нуклеиновых кислот, прежде всего РНК и ДНК хозяина, в респираторных клинических образцах. В результате лишь небольшая часть прочтений может соответствовать целевому вирусу, особенно в образцах с высокими Ct-значениями или деградированными нуклеиновыми кислотами [174–176]. Было показано, что большинство прочтений в клинических образцах происходило от генома человека, а доля вирусных прочтений снижалась по мере увеличения Ct-значений, что могло приводить к низкому или отсутствующему покрытию вирусного генома [173]. Данное ограничение напрямую влияет на необходимую

глубину секвенирования и полноту восстановления генома. В метагеномных пайплайнах для получения достаточного количества вирусных прочтений и реконструкции полного генома зачастую требуется значительно большая суммарная глубина секвенирования. Сообщалось, что респираторные образцы могут содержать значительный избыток нуклеиновых кислот хозяина, что снижает чувствительность mNGS при анализе малопредставленных патогенов, а вирус-ориентированная mNGS-диагностика нередко требует миллионов прочтений на образец [177,178]. В отличие от этого, ампликонное секвенирование обеспечивает предварительное обогащение вирусного генома перед секвенированием и, соответственно, обычно требует меньшего объема секвенирования для достижения высокого покрытия вирусного генома при наличии подходящей вирусной мишени и корректно разработанной панели праймеров [179].

Дополнительным ограничением является необходимость более сложной биоинформатической обработки данных. В отличие от ампликонного секвенирования, при котором большинство прочтений ожидаемо происходит от целевого вируса и может быть напрямую картировано на соответствующий референсный геном, метагеномные данные содержат смешанные последовательности хозяина, бактерий, вирусов и компонентов окружающей среды. В связи с этим анализ обычно включает обрезку (тримминг) адаптеров и низкокачественных прочтений, удаление последовательностей хозяина, таксономическую классификацию, картирование на референсный геном и/или сборку *de novo* с последующей интерпретацией низкоинтенсивных сигналов [179–181]. Так, в исследовании Goya и соавт. реконструкция геномов hPIV2 и hPIV4 потребовала фильтрации прочтений, картирования на референсный геном и сборки *de novo* после метагеномного секвенирования или секвенирования с гибридным захватом [160]. Дополнительные сложности связаны с контаминацией и интерпретацией обнаруженных последовательностей. Поскольку метагеномное секвенирование способно выявлять любые нуклеиновые кислоты, присутствующие в образце, лабораторные или реагентные контаминанты могут приводить к ложноположительным сигналам, особенно в образцах с низкой биомассой [179,182].

Таким образом, метагеномные подходы, включая стратегии амплификации, независимые от последовательности, представляют собой альтернативу таргетному ампликонному секвенированию, обеспечивая восстановление вирусных геномов без предварительной разработки вирус-специфичных панелей праймеров. Однако их эффективность в значительной степени

зависит от вирусной нагрузки, доли фоновых нуклеиновых кислот хозяина, глубины секвенирования и используемого биоинформатического пайплайна для классификации прочтений и сборки генома.

1.6 Молекулярная эпидемиология и филогенетический анализ hPIV

Молекулярная эпидемиология стала важным инструментом для изучения циркуляции, эволюции и генетического разнообразия вирусов парагриппа человека. Сочетая данные о нуклеотидных последовательностях с временной и географической информацией, филогенетические подходы позволяют исследовать закономерности передачи вирусов, эволюционные взаимосвязи и циркуляцию генетически различных вариантов вирусов на региональном и глобальном уровнях. В отличие от традиционного эпидемиологического надзора, основанного главным образом на клинических и демографических данных, подходы, основанные на анализе последовательностей, позволяют напрямую сравнивать вирусные геномы и идентифицировать генетически родственные штаммы, циркулирующие в разных странах и в разные эпидемические сезоны [183–185].

Исторически сложилось так, что молекулярно-эпидемиологические исследования hPIV в основном основывались на секвенировании отдельных геномных регионов, включая гены, кодирующие гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и гликопротеины слияния (F), а также, реже, другие геномные регионы в зависимости от дизайна исследования и изучаемого типа. Среди этих мишеней ген HN наиболее широко используется для филогенетического анализа, поскольку он представляет собой один из наиболее вариабельных регионов генома hPIV [16]. Белок HN играет ключевую роль в прикреплении и проникновении вируса, что делает соответствующий ген удобным молекулярным маркером для молекулярно-эпидемиологических и филогенетических исследований. Анализ этих геномных регионов позволил идентифицировать многочисленные генетические группы, кластеры и линии внутри различных типов hPIV и предоставил важные сведения о генетическом разнообразии вируса и глобальных закономерностях его циркуляции [16,153,186].

Для hPIV1 молекулярно-эпидемиологические и филогенетические исследования были сосредоточены в основном на анализе гена HN, хотя были также проведены дополнительные исследования на основе генов F и P, а также полных последовательностей генома. Анализ последовательностей этих геномных регионов выявил существенное генетическое разнообразие

среди циркулирующих штаммов hPIV1 и идентифицировал несколько филогенетически различных вирусных групп, описанных в исследованиях из разных географических регионов. Одно из первых молекулярно-эпидемиологических исследований hPIV1 было проведено Mizuta и соавт., которые проанализировали последовательности гена HN изолятов, собранных в префектуре Ямагата (Япония), и выявили два основных генетических кластера [149].

Вскоре после этого Beck и соавт. выполнили филогенетический анализ с использованием как полных геномных последовательностей, так и последовательностей гена HN и продемонстрировали сходную общую филогенетическую топологию между деревьями, построенными на основе полного генома и гена HN, показав, что современные вирусы hPIV1 подразделяются на три основных клайда [90]. Позднее исследование, проведённое в Хорватии, подтвердило пригодность генов HN, F и Р для генотипирования hPIV1 и отнесло циркулирующие штаммы к филогенетическим ветвям, соответствующим ранее описанным клайдам II и III [186]. Дальнейшие исследования, основанные на анализе гена HN, расширили представления о филогенетическом разнообразии hPIV1. Исследование, проведённое во Вьетнаме, показало, что начиная с середины 1990-х годов hPIV1 дивергировал на две различные монофилетические линии, обозначенные как клайды 1 и 2, которые впоследствии коциркулировали по всему миру [31]. В дальнейшем Vose и соавт., используя полногеномное секвенирование штаммов hPIV1, выделили три основные филогенетические клайды и показали, что в исследуемый период циркулировали преимущественно две основные клайды (клайды 2 и 3), тогда как клайда 1 в основном включала штаммы, выявленные в конце 1990-х годов [19].

Дальнейшие филогенетические исследования, основанные на полных последовательностях генов HN и F китайских штаммов hPIV1, также продемонстрировали наличие трёх основных филогенетических клайд [187]. В филогении, построенной по гену F, клайда 1 включала штаммы, выявленные в США в период с 1997 по 1999 год, клайда 2 включала большинство штаммов, обнаруженных между 1999 и 2009 годами, и дополнительно подразделялась на клайды 2.1–2.3, тогда как клайда 3 преимущественно содержала штаммы, циркулировавшие после 2009 года. Сходные паттерны кластеризации наблюдались и в филогенетическом дереве, построенном на основе гена HN [187]. Впоследствии Shao и соавт. проанализировали полные кодирующие последовательности генов HN и F и аналогичным образом продемонстрировали разделение hPIV1 на три основные клайды [17].

В более поздних исследованиях для характеристики разнообразия hPIV1 были использованы дополнительные филогенетические и статистические критерии. В исследовании, посвящённом hPIV, циркулирующим в Германии, были проанализированы полноразмерные последовательности гена HN, а филогенетические клайды определялись как монофилетические кластеры с высокой статистической поддержкой (бутстреп $\geq 80\%$), содержащие как минимум три эпидемиологически несвязанные последовательности, а также на основании среднего генетического p-расстояния согласно критериям, адаптированным из работы Goya и соавт. [32]. Согласно данному определению, филогенетический анализ позволил выделить три основные клайды hPIV1 [188].

В более позднем исследовании, с увеличением количества последовательностей hPIV1, доступных в базе данных GenBank, Zhu и соавт. выполнили филогенетический анализ как кодирующих последовательностей гена HN, так и полных геномов и классифицировали hPIV1 на четыре различные клайды, обозначенные A–D, на основании филогенетической топологии, критериев генетической дистанции и значений статистической поддержки ветвей, полученных с использованием байесовского анализа MCMC [18]. Примечательно, что несколько китайских штаммов вместе с дополнительным штаммом, ранее выявленным в провинции Цзилинь (Китай), сформировали новую отдельную клайду D [18].

Основные филогенетические группы hPIV1, описанные в предыдущих исследованиях на основании анализа последовательностей гена HN, представлены на рисунке 6. Представленная схема позволяет визуализировать филогенетическую структуру hPIV1, описанную различными авторами, и облегчает интерпретацию результатов молекулярно-эпидемиологических исследований данного типа вируса.

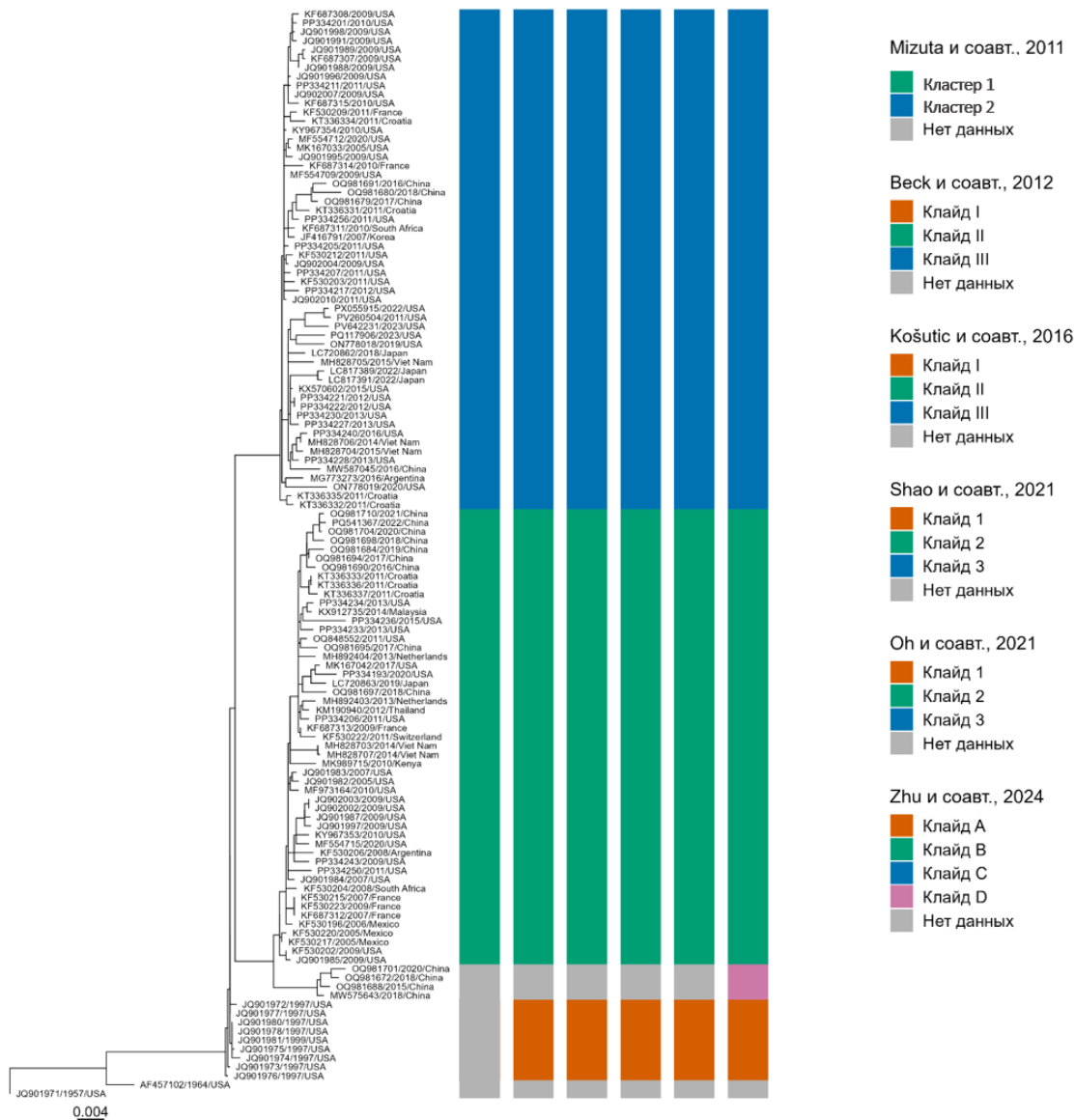


Рисунок 6. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных кодирующих последовательностей гена HN вируса hPIV1. Дерево построено с использованием репрезентативного набора последовательностей, отобранных из ранее опубликованных исследований. Вертикальные цветные панели отражают принадлежность штаммов к филогенетическим группам согласно схемам классификации, предложенным различными авторами. Серым цветом обозначены последовательности, для которых соответствующая классификация в оригинальной публикации отсутствовала. Масштабная линейка соответствует числу нуклеотидных замен на сайт.

Для hPIV2 большинство филогенетических исследований были сосредоточены на анализе гена HN, хотя в ряде работ дополнительно изучались ген F и, в более поздних исследованиях, полные геномные последовательности. Ранние молекулярные исследования в основном были направлены на изучение генетической variability, связанной с антигенными и биологическими свойствами вируса. Один из первых анализов hPIV2, основанных на изучении нуклеотидных последовательностей, продемонстрировал существование двух филогенетически различных вирусных кластеров на основании последовательностей генов HN и F, полученных из клинических изолятов [153]. Несмотря на ограниченное число проанализированных последовательностей, данное исследование предоставило ранние доказательства значительной генетической гетерогенности среди циркулирующих штаммов hPIV2.

Последующие филогенетические исследования, основанные на анализе гена HN, существенно расширили представления о генетическом разнообразии hPIV2. Анализ штамма hPIV2, выявленного в Саудовской Аравии, продемонстрировал его тесное филогенетическое родство с современными штаммами, циркулирующими в США, и позволил предположить существование четырёх филогенетических групп, обозначенных как G1–G4, на основании анализа гена HN [150]. Кроме того, в белке HN были выявлены множественные аминокислотные замены, включая несколько уникальных изменений, что свидетельствовало о продолжающейся молекулярной эволюции циркулирующих штаммов hPIV2 [150]. В дальнейшем данная система кластерной классификации широко использовалась в крупных исследованиях, посвящённых изучению генетического разнообразия hPIV2. Так, последующие исследования, проведённые в Хорватии с использованием последовательностей генов HN и F, показали, что оба геномных региона одинаково пригодны для филогенетического анализа, а также продемонстрировали, что доминирующие циркулирующие вирусы в период 2011–2014 гг. относились к кластеру G3, тогда как только один штамм группировался в генетически удалённый кластер G1a [154]. Продлённый эпидемиологический надзор в Хорватии позднее продемонстрировал замену ранее доминировавшего генотипа G3 вирусами G1a в период между 2011 и 2017 гг [189].

Дополнительные филогенетические исследования выявили ещё большую сложность эволюционной структуры hPIV2. Анализ китайских штаммов hPIV2 позволил идентифицировать новый подкластер hPIV2, обозначенный как G1c, на основании филогении гена HN [17]. В более поздних исследованиях для характеристики разнообразия hPIV2 были использованы

дополнительные филогенетические и статистические подходы. Анализ последовательностей гена HN штаммов из Германии условно разделил hPIV2 на две основные группы и шесть филогенетических клайдов на основании филогенетической топологии, бутстреп-поддержки, эпидемиологической независимости последовательностей и анализа генетического р-расстояния [188].

В дальнейшем более масштабный филогенетический анализ глобальных последовательностей гена HN продемонстрировал, что hPIV2 может быть разделён на два основных кластера, а также на несколько линий и подлиний с использованием статистически обоснованных пороговых значений генетической дистанции между филогенетическими группами [91]. Данное исследование также показало коциркуляцию нескольких линий hPIV2 в Китае и выявило географические паттерны кластеризации для отдельных вирусных групп, включая подлинии, преимущественно выявляемые в Китае [91].

Позднее исследования, основанные на полногеномном секвенировании штаммов из Китая, продолжили использовать ранее предложенные схемы классификации hPIV2. В частности, новые штаммы hPIV2 были отнесены к ранее описанному клайде G3 и линии G1a на основании филогенетического анализа гена HN, что продемонстрировало коциркуляцию этих филогенетических групп вместе со штаммами из Северной Америки, Европы и Азии [18].

Параллельно исследования, основанные на анализе гена F, предоставили дополнительные сведения об эволюции hPIV2. Филогенетический анализ глобальных последовательностей гена F продемонстрировал дивергенцию hPIV2 на два основных эволюционных кластера, которые, вероятно, произошли от общего предка примерно сто лет назад [190]. Сравнительный анализ также показал, что кластер, характеризующийся более высокими темпами эволюции и большим генетическим разнообразием, соответствовал кластеру II, ранее описанному в HN-основанных филогенетических исследованиях, тогда как более генетически стабильный кластер, выделенный по гену F, соответствовал кластеру I в HN-основанной классификации [190]. Совсем недавно полногеномные эволюционные исследования hPIV2 и hPIV4 дополнительно продемонстрировали различную эволюционную динамику отдельных геномных регионов и подчеркнули возрастающую роль полногеномного секвенирования в изучении молекулярной эпидемиологии и эволюции hPIV [160].

На рисунке 7 обобщены основные филогенетические группы hPIV2, выделенные в предыдущих исследованиях на основании анализа последовательностей гена HN.

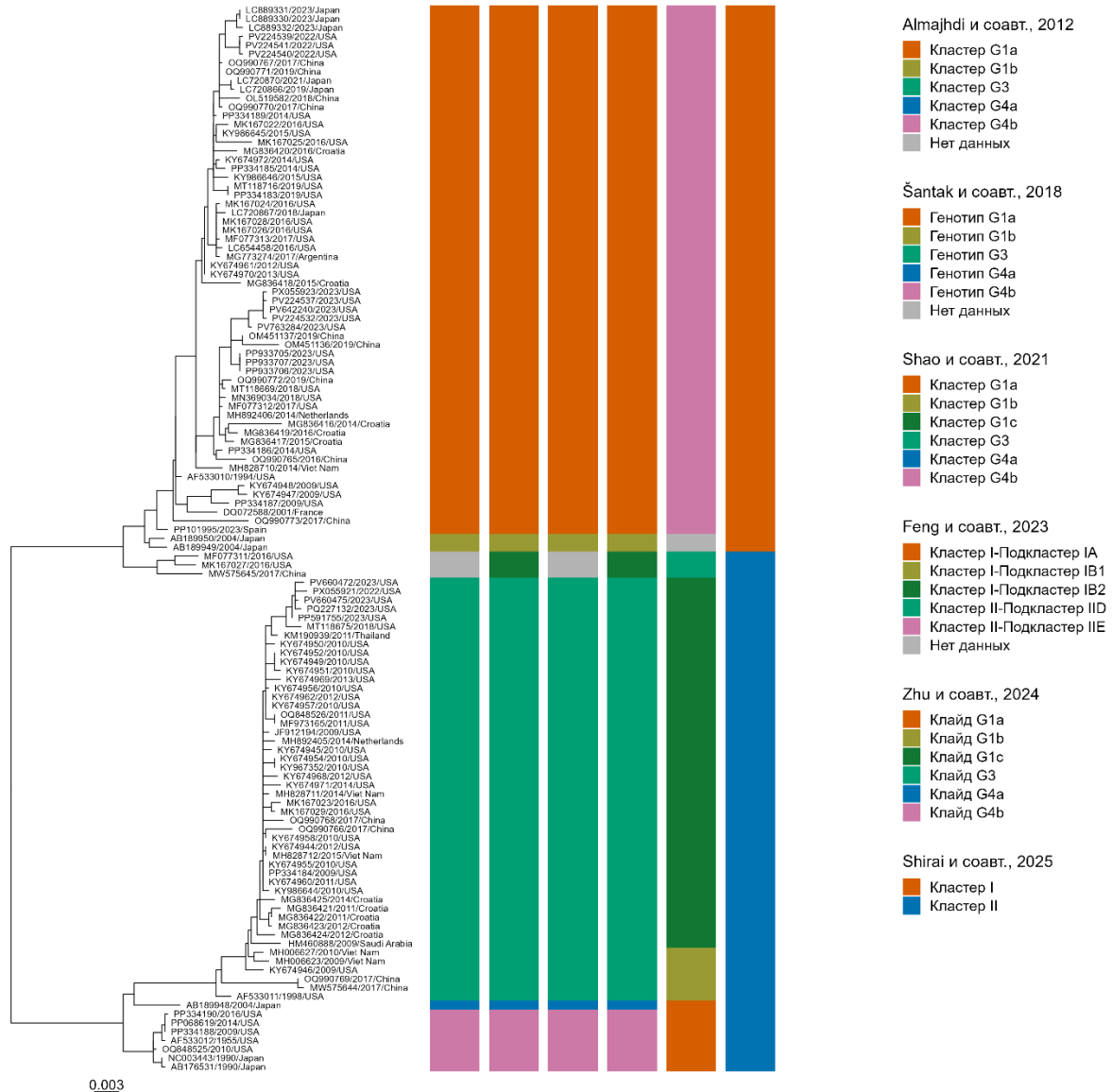


Рисунок 7. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных кодирующих последовательностей гена HN вируса hPIV2 с отображением подходов к филогенетической классификации, предложенных различными исследовательскими группами. Обозначения цветowych панелей и прочие условные обозначения аналогичны представленным на рисунке 6.

Для hPIV3 молекулярно-эпидемиологические исследования были более многочисленными по сравнению с другими типами, и большинство филогенетических анализов основывалось на исследовании гена HN. Структура HN-основанного филогенетического дерева, наиболее широко использовавшаяся в последующих исследованиях, была первоначально описана Мао и соавт., которые разделили hPIV3 на три основных кластера, обозначенных как А, В и С, при этом кластер С был дополнительно подразделён на подкластеры С1–С4. Внутри подкластера С3 были дополнительно описаны линии С3а, С3б и С3с, отражающие дальнейшую диверсификацию недавно циркулировавших штаммов [16].

В дальнейшем данная схема была уточнена Almajhdi и соавт. с использованием расширенного набора полногеномных последовательностей гена HN. Обновлённый анализ сохранил три основных кластера А–С, однако дополнительно модифицировал внутреннюю структуру кластера С путём добавления нового подкластера С5, подразделения С1 на С1а и С1б, а также реорганизации С3 в линии С3а, С3б и С3с. В исследовании также подчёркивалось, что кластер С представляет собой наиболее динамичную и широко распространённую группу вариантов hPIV3, выявленных в XXI веке [30].

После формирования данной расширенной HN-основанной схемы несколько региональных исследований использовали её для характеристики циркулирующих штаммов hPIV3 и сообщили о дальнейшей диверсификации внутри кластера С. В Аргентине анализ последовательностей гена HN привёл к описанию четырёх дополнительных линий, обозначенных как С1с, С3d, С3е и С3f [32]. Аналогично, комбинированный анализ генов HN и F в Испании подтвердил общую структуру кластера С и выявил дополнительную линию С1с, при этом филогенетическая классификация на основе генов HN и F была согласованной [191]. В Хорватии сравнение полных последовательностей генов HN и F также продемонстрировало идентичную филогенетическую классификацию исследованных штаммов, подтверждая пригодность как HN-, так и F-регионов для молекулярно-эпидемиологических исследований hPIV3 [192].

Более поздние исследования продолжили уточнение внутренней структуры кластера С и расширение числа распознаваемых линий hPIV3. Анализ последовательностей гена HN у пациентов с тяжёлой острой респираторной инфекцией в Пекине продемонстрировал продолжающуюся диверсификацию внутри подкластера С3 и выявил две коциркулирующие вирусные группы, связанные с С3а, в течение исследуемого периода [193]. Подробный

молекулярно-эволюционный анализ глобальных последовательностей гена HN впоследствии позволил дополнительно охарактеризовать генетические линии C1d и C3g в рамках существующей HN-основанной филогенетической схемы [33]. Дополнительные исследования из Китая также подтвердили продолжающуюся диверсификацию вариантов кластера C, при этом вновь полученные последовательности были классифицированы в линии C3a и C3f [17].

Параллельно с HN-основанными исследованиями подходы, основанные на полногеномном секвенировании, предоставили дополнительный филогенетический контекст для изучения эволюции hPIV3. Во Вьетнаме было показано, что полногеномная филогения в значительной степени согласуется с филогенией, основанной на гене HN, и демонстрирует наличие нескольких глобально циркулирующих вирусных клейдов [31]. Впоследствии более крупное полногеномное исследование глобальных геномов hPIV1 и hPIV3 подтвердило преобладание кластера C среди доступных геномных последовательностей hPIV3 и включало подкластеры C1, C2, C3 и C5, при этом в наборе данных были представлены несколько линий внутри C1 и C3 [19].

Сопоставимые HN-основанные филогенетические структуры были также описаны и для других географических регионов. Анализ полных последовательностей гена HN штаммов hPIV3 из Кении продемонстрировал разделение глобальных вирусов hPIV3 на ранее установленные кластеры A, B и C, при этом кластер C дополнительно подразделялся на C1a, C1b, C2, C3a, C3b, C3c, C4 и C5 [194]. Более поздние исследования продолжили уточнение HN-основанной филогенетической структуры hPIV3. Анализ немецких последовательностей hPIV3 подтвердил наличие установленных кластеров A–C и подкластеров C1–C3 и C5, при этом для характеристики использовались только кластерный и подкластерный уровни классификации [188]. Во время вспышки в Сеуле в 2022 году анализ частичных последовательностей гена HN выявил отдельную группу, ответвляющуюся от C3a и предварительно обозначенную как C3h [195]. Наиболее недавно комбинированный анализ HN- и полногеномных последовательностей из Китая классифицировал hPIV3 на клейды A–C, при этом клейда C дополнительно подразделялась на линии C1–C6; в рамках данной схемы C1 включала подлинии C1a–C1d, тогда как C3 включала подлинии C3a–C3g [18].

Основные филогенетические группы hPIV3, описанные в литературе на основе анализа последовательностей гена HN, представлены на рисунке 8.

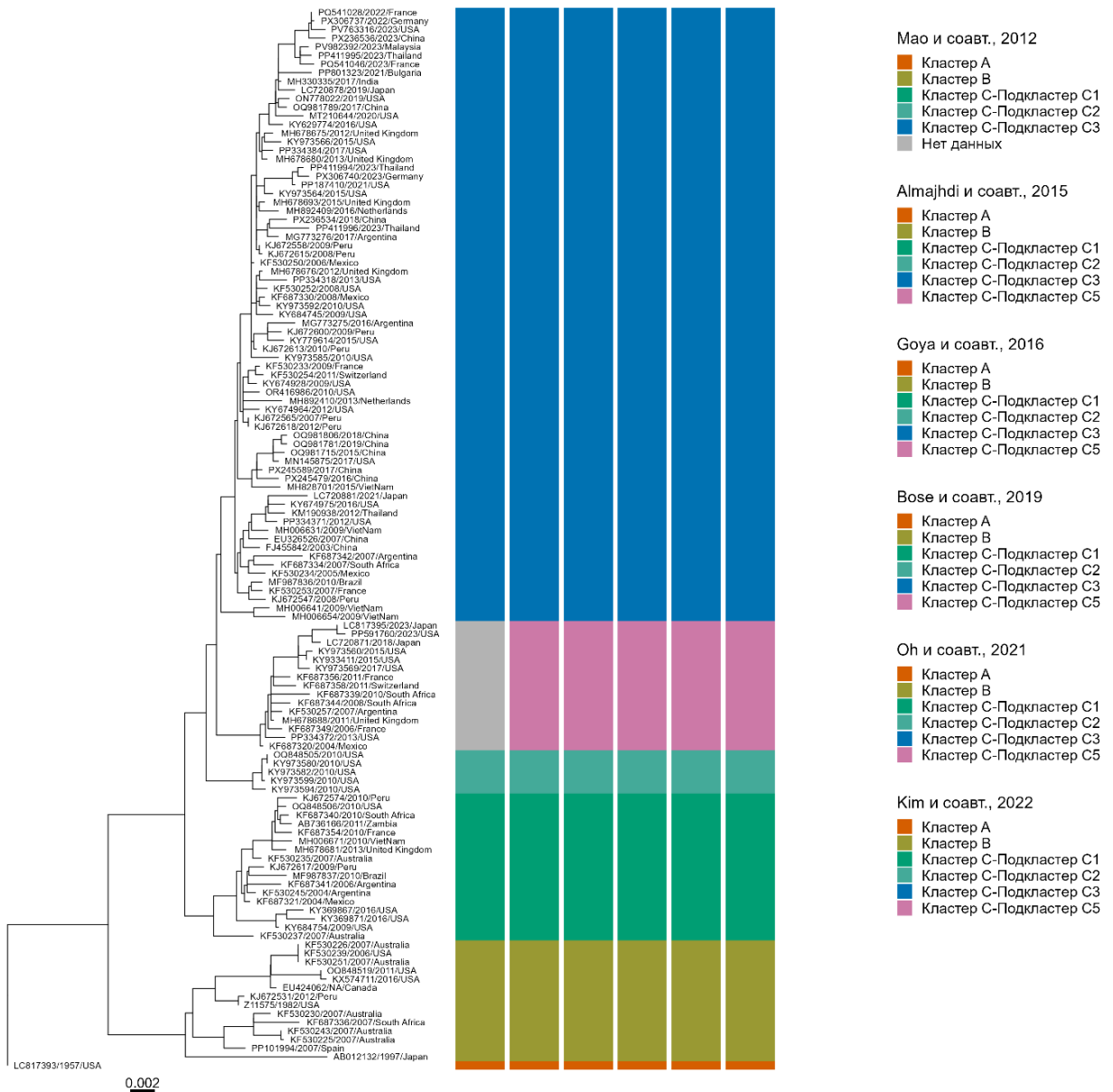


Рисунок 8. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных кодирующих последовательностей гена HN вируса hPIV3 с отображением подходов к филогенетической классификации, предложенных различными исследовательскими группами. Обозначения цветowych панелей и прочие условные обозначения аналогичны представленным на рисунке 6.

По сравнению с тремя типами hPIV, hPIV4 исторически оставался наименее изученным, а ранние молекулярные исследования были преимущественно ограничены характеристикой отдельных генов, а не комплексным филогенетическим анализом. Первые исследования, проведённые в Японии в 1990-х годах, обеспечили начальную молекулярную характеристику hPIV4 посредством секвенирования нескольких структурных генов, включая NP, P, M, F и HN, для обоих подтипов hPIV4a и hPIV4b [155,196–199]. Последующие исследования дополнительно расширили объём доступной последовательностной информации и подтвердили генетические различия между hPIV4a и hPIV4b с использованием анализа различных геномных регионов, включая гены P, F и HN [112,142]. В тот же период были получены первые полные геномные последовательности hPIV4, что обеспечило важные референсные геномные данные для hPIV4a и hPIV4b и позволило проводить более широкие филогенетические сравнения внутри семейства *Paramyxoviridae* [200–202].

Ранние филогенетические исследования hPIV4 в целом были ограничены небольшим числом доступных последовательностей и в основном сосредоточены на различении двух признанных подтипов — hPIV4a и hPIV4b. Исследования из Японии и Китая последовательно демонстрировали коциркуляцию обоих подтипов, хотя hPIV4a обычно преобладал [36,113,143]. Дополнительные метагеномные и полногеномные исследования также выявили генетически дивергентные штаммы hPIV4 и подчеркнули ограниченную представленность глобального разнообразия hPIV4 в общедоступных базах данных [203,204].

Более детальная филогенетическая классификация hPIV4 появилась лишь в последние годы с увеличением количества доступных HN- и полногеномных последовательностей. Анализ полных последовательностей гена HN штаммов из Китая предложил более структурированную филогенетическую схему, в рамках которой штаммы hPIV4 первоначально разделялись на два основных подтипа — hPIV4a и hPIV4b, тогда как штаммы hPIV4a дополнительно подразделялись на три основных кластера (I–III), при этом кластер III далее разделялся на четыре отдельные линии [152]. Примерно в тот же период филогенетический анализ немецких штаммов hPIV4 на основе последовательностей гена HN аналогичным образом выделил две основные группы, соответствующие hPIV4a и hPIV4b, и дополнительно подразделил их на отдельные клады на основании филогенетической топологии, бутстреп-поддержки и критериев генетической дистанции [188].

В более поздних исследованиях использование расширенных наборов последовательностей и полногеномного анализа позволило дополнительно уточнить филогенетическую структуру hPIV4. С использованием байесовского филогенетического анализа HN- и полногеномных последовательностей Zhu и соавт. предложили классификацию как hPIV4a, так и hPIV4b на три основные клады, обозначенные А–С, с дополнительным подразделением клады С на несколько линий [18]. Последующие полногеномные эволюционные исследования дополнительно расширили классификацию hPIV4, подразделив hPIV4a на группы А.1 и А.2, а hPIV4b — на группы В.1–В.3, одновременно продемонстрировав различающиеся эволюционные паттерны между различными геномными регионами вируса [160].

Основные филогенетические группы hPIV4, описанные в предыдущих исследованиях на основании анализа последовательностей гена HN, представлены на рисунке 9. Представленная схема иллюстрирует генетическое разнообразие hPIV4 и обобщает современные представления о филогенетической структуре данного типа вируса.

Таким образом, молекулярно-эпидемиологические исследования hPIV по-прежнему преимущественно основываются на филогенетическом анализе отдельных геномных регионов, прежде всего гена HN. Несмотря на всё более широкое использование полногеномного секвенирования в последних исследованиях, число доступных полных геномных последовательностей hPIV остаётся относительно ограниченным по сравнению со многими другими респираторными вирусами.

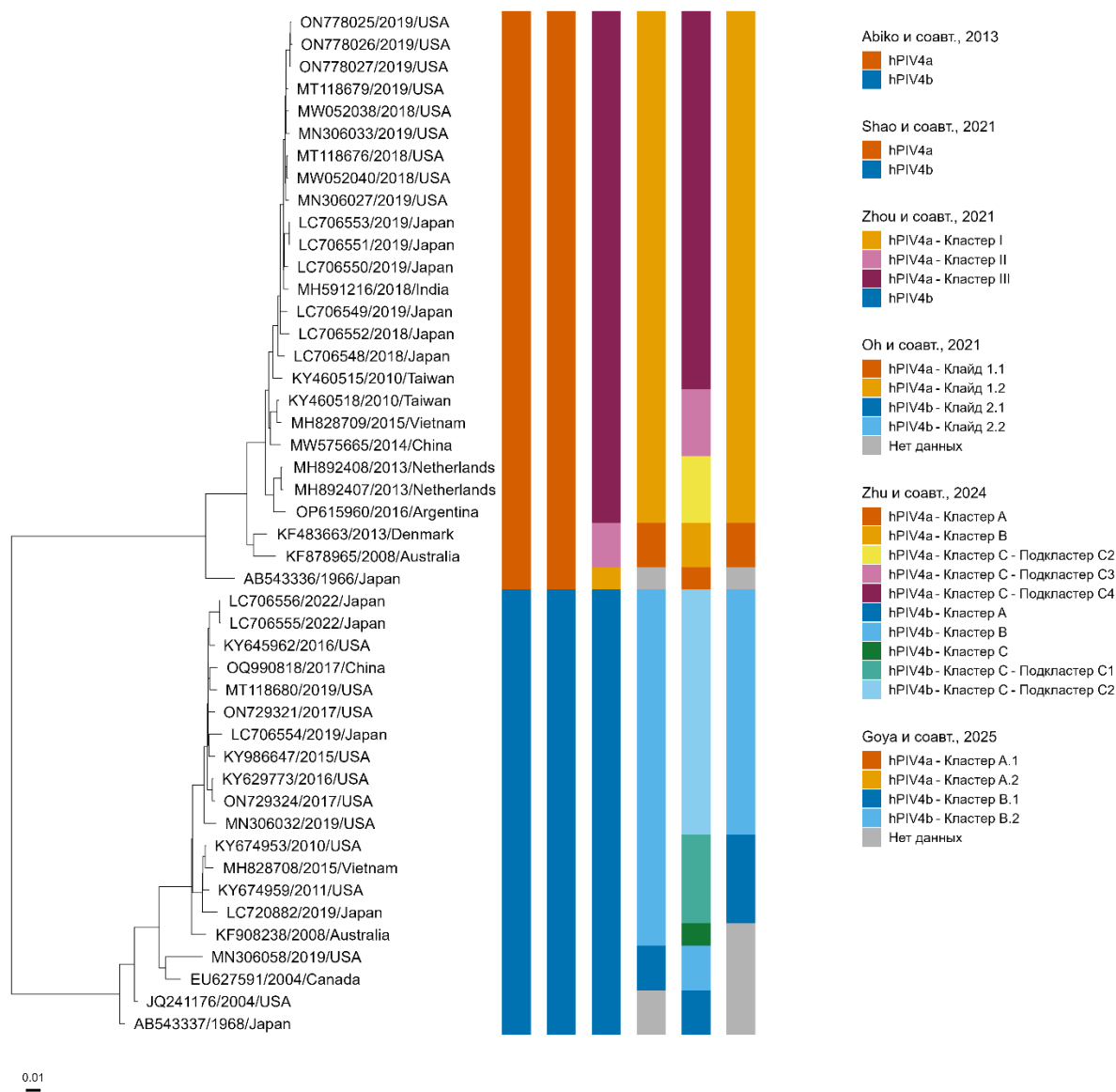


Рисунок 9. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных кодирующих последовательностей гена HN вируса hPIV4 с отображением подходов к филогенетической классификации, предложенных различными исследовательскими группами. Обозначения цветowych панелей и прочие условные обозначения аналогичны представленным на рисунке 6.

1.7 Выделение вирусов парагриппа человека в клеточных культурах

Выделение вирусов hPIV в клеточной культуре исторически являлось одним из основных подходов для изучения биологии вируса, его патогенности и антигенных свойств. До широкого внедрения молекулярных методов диагностики выделение вируса служило основным способом подтверждения инфекции и получения вирусного материала для дальнейшей характеристики [92,205].

Было показано, что вирусы hPIV в целом реплицируются более эффективно в клеточных линиях эпителиального происхождения по сравнению с фибробластными клеточными системами, что отражает природный тропизм вируса к респираторному эпителию. Эти эпителиальные клеточные линии экспрессируют поверхностные рецепторы, совместимые со свойствами связывания гликопротеина гемагглютинин–нейраминидаза, что способствует проникновению вируса в клетку и продуктивной инфекции [4]. Для выделения и культивирования hPIV используется широкий спектр чувствительных клеточных линий, включая LLC-MK2, Vero, HEp-2, MDCK, ВНК, HeLa, а также первичные культуры клеток почки обезьян. Среди них первичные культуры клеток почки обезьян считаются наиболее чувствительными для первичного выделения вируса, особенно для hPIV1 и hPIV2, однако их применение ограничено практическими трудностями, такими как высокая вероятность контаминации и ограниченная доступность [29,149,206,207]. Тем не менее клеточная линия LLC-MK2 является одной из наиболее широко используемых систем для выделения hPIV благодаря простоте культивирования, воспроизводимости результатов и способности поддерживать репликацию нескольких типов. Несмотря на несколько более низкую чувствительность по сравнению с первичными культурами клеток почки обезьян при первичном выделении, клетки LLC-MK2 хорошо подходят для рутинной лабораторной работы и последующего пассирования вируса [208,209]. Помимо LLC-MK2, клетки MA-104, полученные из эпителия почки зелёной мартышки, также используются для культивирования парамиксовирусов. Эти клетки характеризуются высокой восприимчивостью к вирусной инфекции и выраженным развитием цитопатического эффекта, что делает их удобной моделью для изучения динамики вирусной репликации и цитопатологических изменений [22].

Эффективность выделения hPIV может быть дополнительно повышена за счёт добавления экзогенных протеаз, таких как трипсин, в поддерживающую среду. Трипсин способствует расщеплению вирусного белка слияния, что является критически важным этапом для слияния

мембран и продуктивной инфекции, тем самым повышая эффективность выделения вируса для отдельных типов и штаммов hPIV [209].

Характерной особенностью репликации вируса в клеточной культуре является развитие цитопатического действия (ЦПД), отражающего индуцированные вирусом морфологические изменения инфицированных клеток, которые могут наблюдаться при микроскопическом исследовании. ЦПД при инфекции hPIV характеризуется рядом признаков, включая округление клеток, образование синцитиев, прогрессирующее отслоение клеточного монослоя и последующий лизис клеток [4,22]. Кинетика и выраженность развития ЦПД могут варьировать в зависимости от типа вируса, используемой клеточной линии и исходной вирусной нагрузки в клиническом образце. В ряде случаев ЦПД может проявляться с задержкой или быть слабо выраженным, что требует проведения нескольких пассажей для достижения детектируемого уровня репликации вируса [210]. Следует отметить, что эффективность выделения вируса может существенно различаться между типами hPIV. В частности, для hPIV2 и hPIV4 часто отмечаются более низкие показатели выделения по сравнению с hPIV1 и hPIV3, что, вероятно, связано с различиями в кинетике репликации, использовании рецепторов и стабильности вирусных частиц в клинических образцах [4,10].

Помимо морфологической оценки, классические вирусологические методы, такие как реакция гемагглютинации (РГА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА), широко применяются для выявления и количественной оценки hPIV. РГА основана на способности гликопротеина HN связываться с рецепторами сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов, что приводит к их видимой агглютинации. Этот метод обеспечивает быстрый и относительно простой способ подтверждения присутствия вируса в культуральных супернатантах и оценки вирусных титров [211]. РТГА представляет собой дополнительный метод, используемый для антигенной характеристики вирусов. В данной реакции специфические антитела ингибируют взаимодействие вирусных частиц с эритроцитами, предотвращая гемагглютинацию. РТГА исторически широко применялась для типирования вирусов и оценки антигенного родства между штаммами, играя важную роль в эпидемиологических исследованиях респираторных вирусов [212,213].

Однако чувствительность методов, основанных на гемагглютинации, варьирует в зависимости от типа вируса и используемого типа эритроцитов. В то время как hPIV1–3 обычно демонстрируют выраженную гемагглютинирующую активность, для hPIV4 часто характерно

отсутствие гемагглютинации в стандартных лабораторных условиях, что ограничивает применимость данного метода для его выявления [35,112,214]. В связи с этим отсутствие гемагглютинации не следует интерпретировать как отсутствие репликации вируса и должно оцениваться в сочетании с молекулярными методами.

Несмотря на их длительное применение, классические вирусологические методы имеют ряд существенных ограничений. Выделение вируса является трудоёмким и длительным процессом, эффективность которого в значительной степени зависит от качества образца, вирусной нагрузки и используемой клеточной системы [210]. Не все клинические образцы позволяют получить жизнеспособный вирус, особенно при низкой концентрации вирусной РНК или деградации материала. Кроме того, многократные пассажи в клеточной культуре могут приводить к появлению адаптационных мутаций, не отражающих генетическую структуру вируса *in vivo*, что может влиять на результаты последующего анализа [215].

Несмотря на то, что классические вирусологические методы в значительной степени уступили место современным молекулярным подходам, они сохраняют важное значение в исследовательской практике. Выделение вируса позволяет получить живой вирусный материал для дальнейших исследований, включая изучение динамики репликации, адаптации к клеточной культуре и взаимодействия вируса с клетками хозяина. В сочетании с методами секвенирования выделение вируса обеспечивает важную связь между генотипическими и фенотипическими характеристиками, способствуя более полному пониманию биологии вируса.

Таким образом, интеграция классических вирусологических методов с молекулярными и геномными подходами представляет собой взаимодополняющую стратегию, повышающую полноту и надёжность исследований вирусов парагриппа человека.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Исследованные образцы

В качестве исследуемого материала использовали назофарингеальные и орофарингеальные мазки, полученные от госпитализированных пациентов. Образцы собирали в рамках госпитального надзора за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями (Global Influenza Hospital Surveillance Network — GIHSN) [216], а также в рамках выполнения Государственного задания «Комплексный подход к генетической характеристике и раннему выявлению патогенов с эпидемическим и пандемическим потенциалом с использованием метагеномного секвенирования» в эпидемические сезоны 2017/18–2024/25 гг. Образцы поступали из трёх медицинских учреждений: Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Детская городская больница Св. Ольги и СПб ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова», Санкт-Петербург, Россия. Материал отбирали в транспортную среду для вирусов (UTM-RT, Соран, США) и доставляли в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, с соблюдением холодовой цепи для дальнейшего анализа. Образцы регистрировали и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения молекулярных исследований. Все процедуры проводились в соответствии с действующими рекомендациями.

2.1.2 Вирусы

В качестве положительных контролей использовались следующие штаммы вируса парагриппа человека: вирус парагриппа человека типа 1, штамм С35 (АТСС); вирус парагриппа человека типа 2, штамм Greer (АТСС); вирус парагриппа человека типа 3, штамм С243; вирус парагриппа человека типа 4а, штамм М-25; вирус парагриппа человека типа 4б, штамм СН19503. Штаммы были получены через Международный ресурс реагентов, Отдел гриппа, Сотрудничающий центр ВОЗ по надзору, эпидемиологии и контролю гриппа, Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта, США.

2.1.3 Клеточные линии

В работе использовали эпителиальные клеточные линии почки обезьяны: LLC-MK2 (эпителиальные клетки почки макаки-резуса), полученные из ФГБНУ «Институт

экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия, и МА-104 (клетки почки африканской зелёной мартышки), полученные из Белорусского НИИ микробиологии и эпидемиологии (1987) и депонированные в ИНЦ РАН 25.05.2015, коллекция НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия. Клетки имеют эпителиоидную морфологию, отличаются поляризованностью (апикальная и базальная мембраны имеют различный молекулярный состав и на апикальной мембране присутствует слой ворсинок) и дифференцировкой (при высокой плотности клеток в монослое появляются характерные элементы – гемичеситы, которые образуются вследствие сохранения клетками функции почечного эпителия). Продолжительность жизненного цикла клеток составляет 72-96 часов. В первые сутки после пересева клетки распластаны по поверхности, позже клетки приобретают эпителиоидную морфологию, уплотняются, образуя плотный монослой с признаками дифференцировки.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 100 мкл аликвот респираторных образцов с использованием наборов NAmag p2000 RNA extraction kit (Biolabmix®, Новосибирск, Россия) и MagnaPrime FAST-R (NextBio®, Москва, Россия) на автоматической станции AutoPure-96 (Allsheng, Ханчжоу, Китай) согласно инструкциям производителей. Очищенная РНК была элюирована в 100 мкл элюирующего буфера и была хранена при -80°C до дальнейшего анализа.

2.2.2 Детекция респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Детекция парагриппа осуществлялась методом ПЦР в режиме реального времени при помощи коммерческого набора «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производство ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Данный скрининг позволял одновременно выявлять аденовирусы (hAdVs), бокавирус (hBoV), респираторно-синцитиальные вирусы (hRSVs), метапневмовирусы (hMpVs), риновирусы (hRVs), вирусы парагриппа 1–4 типов (hPIVs) и коронавирусы (типы NL63/229E, OC43/HKU1) (hCoV). Обнаружение вирусов гриппа А/В выполняли с использованием набора «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (производство ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Кроме того, вирус SARS-CoV-2 был обнаружен с помощью диагностического набора для выявления

нуклеиновых кислот нового коронавируса (2019-nCoV) S3102E SC2 (Sansure Biotech, Чанша, Китай).

2.2.3 Выделение hPIV в клеточной культуре LLC-MK2 и MA-104

Назофарингеальные и ротоглоточные мазки, собранные в транспортную среду для вирусов (UTM-RT, Soran, CA, США) не позднее чем через четыре дня от начала заболевания, использовали в качестве клинического материала. С целью (i) разработки и валидации протокола выделения hPIV различных типов и (ii) оценки возникновения мутаций адаптации к клеточной культуре, а также для получения жизнеспособных вирусных изолятов для последующих вирусологических исследований, была отобрана случайная подгруппа образцов, положительных по ОТ-ПЦР со значениями $C_t < 25$ для каждого типа hPIV, из нескольких периодов сбора образцов для выделения вируса. Выделение производилось в специальных 24-луночных планшетах с суточным клеточным монослоем клеток. Для работы готовились два типа сред: промывочная и поддерживающая. На 100 мл среды Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), с L-глутамином, добавляется 0,1 мл ТРСК-трипсина (конечная концентрация 2 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 0,1 мл антибиотика. Поддерживающие среды Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, с L-глутамином, глюкоза 1 г/л; BioloT Ltd., Санкт-Петербург, Россия) и Minimum Essential Medium α (α -MEM, с L-глутамином; BioloT Ltd., Санкт-Петербург, Россия) также добавляли 2,6 мл BSA фракции V 7,5% и 1,6 мл HEPES буфера 1 М. Монослой клеток двукратно отмывали промывочной средой по 1 мл. В две лунки, содержащие клеточную культуру, вносили 100 мкл транспортной среды с клиническим материалом. После адсорбции в течение 45–60 мин при 37 °C вносили 0,9 мл поддерживающей среды DMEM и α -MEM в планшеты с клетками LLC-MK2 и MA-104 соответственно. Планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе в течение 7 суток. Ежедневно под инвертированным микроскопом оценивали целостность монослоя и динамику развития цитопатического действия (ЦПД). Для изолятов hPIV1–3 проводили два последовательных пассажа, для hPIV4 — три пассажа. По окончании инкубации выполняли реакцию гемагглютинации (РГА) с использованием 0,5% эритроцитов морской свинки, курицы и человека. При наличии характерного ЦПД супернатанты отбирали, а выделение вируса подтверждали методом ОТ-ПЦР.

Инфекционную активность определяли методом TCID₅₀ (50% инфекционная доза для культуры клеток) в 96-луночных планшетах с использованием серийных десятикратных разведений вирусосодержащего материала. Для каждого разведения проводили по три повтора. После инкубации клеточные монослои ежедневно оценивали под инвертированным микроскопом на наличие ЦПД. Инфекционный титр рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали как log₁₀ TCID₅₀/мл.

Для антигенной характеристики проводили реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием сывороток, полученных от лабораторных животных, иммунизированных соответствующими изолятами hPIV. Вкратце, группы крыс (n = 3 на каждый тип) иммунизировали вирусосодержащим материалом (5 мл на инокуляцию) четырьмя последовательными введениями с интервалом в 4 дня. Через две недели после последней иммунизации отбирали образцы крови, и сыворотки отделяли центрифугированием. Перед использованием сыворотки инактивировали нагреванием и подвергали серийным разведениям. РТГА проводили с использованием гомологичных и гетерологичных изолятов hPIV и 0,5% суспензий эритроцитов в соответствии со стандартными протоколами [213,217]. Для дополнительной оценки активности антисыворотки к изолятам использовали реакцию нейтрализации вируса в культуре клеток MA-104. Серийные двухкратные разведения антисыворотки инкубировали с вирусосодержащим материалом, после чего смесь вносили на монослой клеток. Результаты оценивали по подавлению развития цитопатического действия.

2.2.4 Разработка панелей праймеров для полногеномной амплификации генома вирусов парагриппа человека

Три набора праймеров, состоящие из 18 пар для hPIV1, 16 пар для hPIV2 и 18 пар для hPIV3 праймеров были разработаны с использованием инструмента PrimalScheme (<https://primalscheme.com>) для покрытия всего вирусного генома (Таблицы 3a,b,c). Дизайн праймеров основан на консенсусной последовательности, полученной в результате множественного выравнивания 227 полных геномов hPIV1, 97 полных геномов hPIV2, и 419 геномов hPIV3 доступных в NCBI (подробная информация приведена в приложении 1,2,3: <https://disk.yandex.com/d/7h1imybnstBwLA>). Каждая пара праймеров покрывает примерно 1 т.п.н. генома с перекрытием ампликонов примерно на 200 п.н. Рисунки 10a, 10b и 10c представляют

собой схематические иллюстрации расположения разработанного набора праймеров вдоль геномов hPIV1, hPIV2 и hPIV3.

Таблица 3. (а) Разработанные панели праймеров для полногеномной амплификации hPIV1 (b) Разработанные панели праймеров для полногеномной амплификации hPIV2 (c) Разработанные панели праймеров для полногеномной амплификации hPIV3.

(a)					
Название	Последовательность	5'- Позиция*	Длина	Tm	GC
hPIV1-F1	ACCAAACAAGAGRAAAAACTTGTTT	1	25	60.3	32
hPIV1-R1	CATGAACGGGTCTCTGAGTATACATATA	1083	29	60.1	37.9
hPIV1-F2	TTACATAAGAGATGCAGGATTAGCATC	896	27	61	37
hPIV1-R2	CGACGTCRAGGAGTCCGATG	1946	20	61	60
hPIV1-F3	CAGCATACACGAAACCAACCTT	1783	22	59.6	45.5
hPIV1-R3	AATTCATGTTGTGATTTTATTACACC	2874	26	59.6	30.8
hPIV1-F4	CCGTAAAGAACGAAGAGCC	2660	20	59.8	55
hPIV1-R4	TGAGRGGGAGAGGTTCTACTGT	3738	22	59.4	54.5
hPIV1-F5	TCYACAATTTCAACCAGCAATC	3558	22	60.1	40.9
hPIV1-R5	GCTGCCCAGATGACTAGATTCAT	4603	23	60.2	47.8
hPIV1-F6	ATTGAGAAGATGAAGYTAATATTCTCTCT	4431	29	59.6	31
hPIV1-R6	GCTAGTGCAATTCCYGCAGTTATC	5500	24	60.5	45.8
hPIV1-F7	GATCTTCAGGAATCCCTGATAACA	5355	24	59.4	41.7
hPIV1-R7	GGACCCACTTTGATGATTTGATT	6436	23	59.8	39.1
hPIV1-F8	CATTCATAAATGGTGGTGTRGTAGCTA	6226	27	59.6	37
hPIV1-R8	CCYGTGGTTCATGACTTCTCTAT	7299	25	59.9	40
hPIV1-F9	TGACAGTATCCTCCGTGAACGA	7114	22	60.4	50
hPIV1-R9	GAGTGCCAACCTGARGATCTAGTATATA	8197	28	59.7	39.3
hPIV1-F10	TGCAATGATGCTCTTAAAGATAACTTG	7995	26	60.5	34.6
hPIV1-R10	AAAATCGGATAAGGTTCAAAAGTGTA	9052	26	60.5	30.8
hPIV1-F11	TGCTAGAYATCAATCAACCTTATGATT	8875	27	61	33.3
hPIV1-R11	TTGCATGACACTCATATAGTGTCTTTAGTAT	9966	31	61.4	32.3
hPIV1-F12	TCATTGATAAAGATTTTCAGAGAGACAT	9792	28	59.8	28.6
hPIV1-R12	CTCATTACATCTTTGACCAAACAATG	10,826	26	60.3	34.6
hPIV1-F13	AAATATGAATAAGTGCAATTCAAATGG	10,673	27	60.9	25.9
hPIV1-R13	CTGGTCTTGATTCATCACACGA	11,730	23	60.1	43.5
hPIV1-F14	GCAATATTGATYCCRGCTAATATAGG	11,559	26	60.6	38.5
hPIV1-R14	GTCGATACAGGAGTGAGTAACTTCAAA	12,621	27	60.7	40.7
hPIV1-F15	TGTAAAGAACTTAAAGCAAGCCGG	12,458	23	61.1	43.5
hPIV1-R15	CACGCATGAAAAGATCAACAGAGTA	13,512	25	61.5	40
hPIV1-F16	AGACACATCACATGCAGTCYTAAGAGT	13,334	27	61	37
hPIV1-R16	AAAACCTTGACCCTTTGACATAAACT	14,371	26	61.5	34.6
hPIV1-F17	GCRGGTGAATGCTGTCTTGT	14,190	21	61	52.4
hPIV1-R17	AATCTTGAGACATAGACAATGCTATCCA	15,172	29	61.8	34.5
hPIV1-F18	AAGCATTACAAATCTTCGGATTTGA	14,896	25	61.8	32
hPIV1-R18	ACCAGACAAGAGTTTAAAGAAATATCGATAT	15,600	30	61.3	30
(b)					
Название	Последовательность	5'- Позиция**	Длина	Tm	GC
hPIV2-F1	ACCAAGGGGAGAATTAGATGGC	1	22	61.4	50
hPIV2-R1	ATGGGTCCTAGACTCTGATARTGTAGC	1083	27	61.2	44.4

hPIV2-F2	CYATGGTGGGAGACATTGGCA	912	21	60.6	52.4
hPIV2-R2	GCTCAGTGGTGTATGTTGGTTCC	2027	23	61	52.2
hPIV2-F3	AADCATAGGCCCGGACGG	1921	18	60.5	51.1
hPIV2-R3	GGATTCRGGCTTTCGTGTGATC	3020	22	61.1	50
hPIV2-F4	YTCCAGTAGTAATTGCYGGTCC	2893	22	61	50
hPIV2-R4	ATAYTCAAATCCAGCTTGTAGCTTTG	3980	26	61.1	38.5
hPIV2-F5	AAGACATCAAGCCAGARGAGGA	3828	23	59.9	47.8
hPIV2-R5	AATAAAGCTAGCRCCACCATCAGT	4951	24	59.5	41.7
hPIV2-F6	AATGATAGTATGCATCTTTGTTATGTACACT	4810	30	59.8	30
hPIV2-R6	CGCTTRAGAAAGTTCCCGATAATA	5907	24	59.8	37.5
hPIV2-F7	GTGACACCRAACTCTGTATTYTGTAG	5780	26	59.6	42
hPIV2-R7	GGCAGTTCGGAAAATGATTCTA	6892	22	59	40.9
hPIV2-F8	TGAYACAGCTTAATCCRCTCAACAT	6775	25	60.8	40
hPIV2-R8	GGAGTTWCCGGCACARGTTATG	7846	22	61.2	54.5
hPIV2-F9	GRAGCGGGATCTATCAYCTAGGC	7710	23	61.4	52.2
hPIV2-R9	GCGGGAAGTGCCTAGTAATAAG	8897	23	61.7	52.2
hPIV2-F10	AAGATTATRATATAGGCCAGAATGGC	8777	26	61.9	38.5
hPIV2-R10	CRATTAATCTGGAGAAAAGTTGGA	9872	25	61.3	36
hPIV2-F11	TGGGTGTCTACAACCTAAAGATCCAG	9697	26	61.3	42.3
hPIV2-R11	ATGTATCATCAGGATCTGTGAGGTATG	10,772	27	60.8	40.7
hPIV2-F12	TCATTGCTTACTATGAGTCAAATTGG	10,610	26	60.2	34.6
hPIV2-R12	CGATATTGCGGTTAAATAATCTGC	11,675	24	60.7	37.5
hPIV2-F13	TCYATTCGTCAACTCACATATGATC	11,501	25	60.8	40
hPIV2-R13	CRATATCAAGTGCATCATTCCAGT	12,614	24	61	41.7
hPIV2-F14	AAGAAGAGTTGCATCAATGGCATA	12,484	24	61	37.5
hPIV2-R14	GCAAGAACTTGTTTAACYCCCCA	13,560	23	60.5	43.5
hPIV2-F15	AGACGTGCAATGAATCTTGATATTATC	13,445	27	60.7	33.3
hPIV2-R15	GTYGATTTCGAGATCTATATGRACAAG	14,559	26	60.9	42.3
hPIV2-F16	WGCAGTTACRGACTTATCRACAAAGGA	14,461	27	62	37
hPIV2-R16	ACCAAGGGGAAAATCAATATGTTTT	15,654	25	61.9	32

(c)

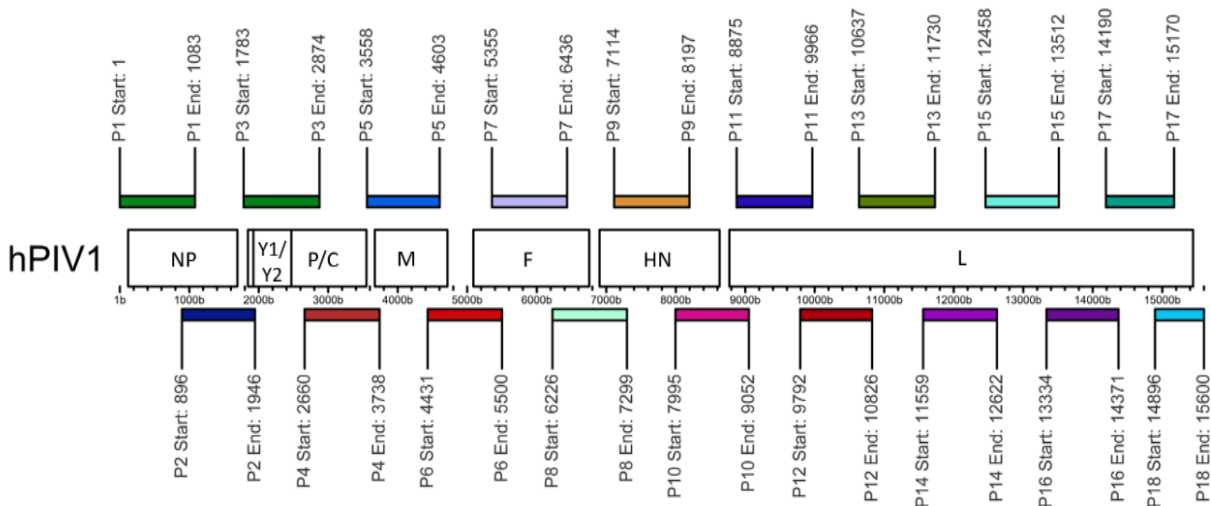
Название	Последовательность	5'- Позиция***	Длина	Tm	GC
hPIV3-F1	GATTAAGACATTGACTAGAAGGTCAAGA	58	29	61	34.5
hPIV3-R1	TGTACAACCTGCCACYCCCATTTG	1135	22	60.8	50
hPIV3-F2	ATGGCAGCTTTGACTYATCCACT	948	24	61.5	45.8
hPIV3-R2	GGGTTCTTGTGTTGATTGKGTCTG	1946	23	61.8	47.8
hPIV3-F3	ATCAAATCATGGATTCTTGGGAAG	1806	24	61.4	37.5
hPIV3-R3	TCCTTTCCATTTGTCTTTTGTGTCT	2832	25	61.5	36
hPIV3-F4	AAAGGGAAAGACTGGTTYAAGAAATC	2510	26	60.7	34.6
hPIV3-R4	GTTCGTTTATATATGATTGYTTTGTGCT	3518	28	60.4	28.6
hPIV3-F5	GCAGTACAATGAGATCACTAGTTGCA	3438	26	60.8	42.3
hPIV3-R5	TCAATCTCATTTTCTCGATTTTCTGT	4545	26	61	30.8
hPIV3-F6	TCAATGTCTTCCACTAGATAGGAGCA	4232	26	61.7	42.3
hPIV3-R6	CTTGTATTGCTTGTATCTGYTGGTCA	5287	28	61.3	40
hPIV3-F7	AAACTACARCATGTAGGTGTAYTGGTC	5141	27	60.6	40.7
hPIV3-R7	CAACCACTCCTCCATTGACRAAT	6224	23	60.6	43.5
hPIV3-F8	GGGCATTTCTAGGTGGAGCAG	6030	21	61.3	57.1
hPIV3-R8	ATGACTCTGAATTGTRAGAAGCCTTGT	7120	27	61.7	37
hPIV3-F9	TTCATCATMTGTGCTAAYTAATTCCATCA	6947	28	61.3	28.6
hPIV3-R9	CATGAATGTCCCCATGGACATT	8211	22	61.7	45.5
hPIV3-F10	CAAGATCTACAAGTTGGCAYAGCAA	8073	25	61	40

hPIV3-R10	TCTTCATTAAGATCATAATTRCTTCCA	9103	27	61.3	29.6
hPIV3-F11	CTGACATACTCTATCCTGAGTGTACCT	8677	28	61.8	46.4
hPIV3-R11	CTTTTCTGCTGCAATACTAGCYTCTA	9776	26	61.5	42.3
hPIV3-F12	ATTCAAACCTCATGATCCTGTYAAACAA	9540	27	61	29.6
hPIV3-R12	GAAACAGCTCACAGTCTCRTATCCAT	10,622	26	61	42.3
hPIV3-F13	AGGAAAATTCTTTCAAGAGAATGGG	10,373	25	61.8	36
hPIV3-R13	TTATAGTTGGATTGATATTCATCCCAAG	11,382	28	61.9	32.1
hPIV3-F14	TATGATGGGAGAATTCTTCCTCAAG	11,157	25	61.1	40
hPIV3-R14	TGATCCTGTTATTACCACCCAG	12,167	23	60.7	47.8
hPIV3-F15	GATATGTGTTTCAGTAGAYCTTGCCAT	12,033	26	61	42.3
hPIV3-R15	CCAAATTGATTTACTAATAATCCACCA	13,138	27	60.8	29.6
hPIV3-F16	GCAATTTCAATATGTACYGCAATTACAA	12,954	28	61.8	28.6
hPIV3-R16	ATTAATTGCAGGTCCYAATGTRGC	14,126	24	61.8	41.7
hPIV3-F17	ARTACARGTGGTTTGACACTTCCTCA	13,914	26	61.5	42.3
hPIV3-R17	ATTCCTCTTCTTTGATAAAATGATCCA	14,714	27	61.6	29.6
hPIV3-F18	TTGATTGGRGATGATGATGTRTTT	14,433	25	60.5	32
hPIV3-R18	AGAACTCTGYTTGGTRTATATATATKACATGTT	15,449	33	60.5	27.3

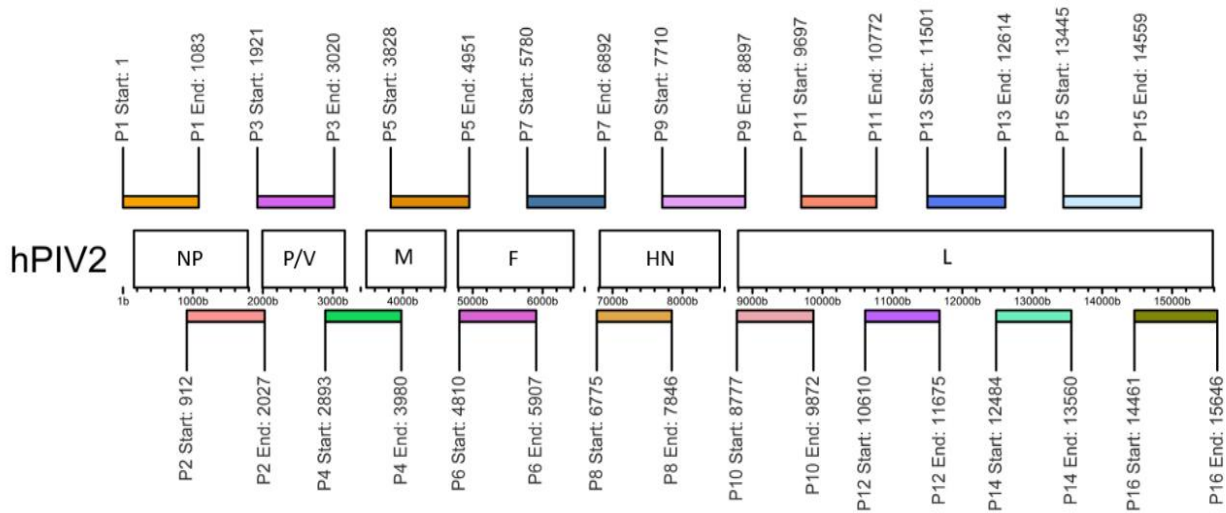
* Позиции нуклеотидов основаны на прототипном штамме Washington/1964 (номер доступа в GenBank: NC_003461).

** Позиции нуклеотидов основаны на прототипном штамме Japan/1990 (номер доступа в GenBank: NC_003443).

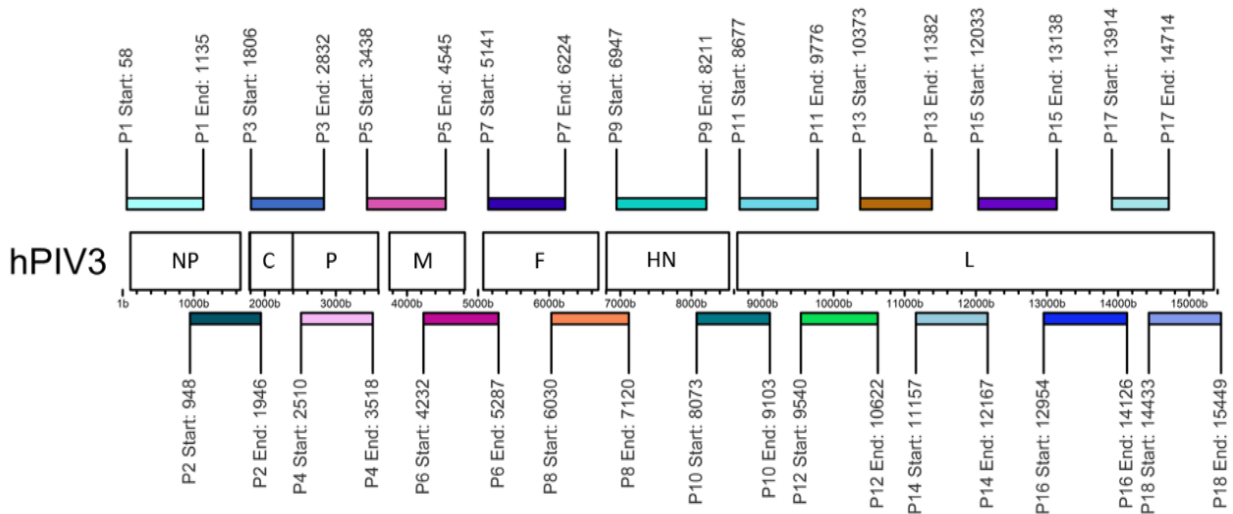
*** Позиции нуклеотидов основаны на прототипном штамме Japan/1997 (номер доступа в GenBank: NC_001796).



(a)



(b)



(c)

Рисунок 10. Диаграммы, иллюстрирующие положения связывания праймеров вдоль геномов hPIV, созданные с использованием скрипта VizCoV в среде RStudio версии 2025.09.3+425 (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>): (a) схематическое представление положений праймеров, отображенных вдоль генома hPIV1; (b) схематическое представление положений праймеров, отображенных вдоль генома hPIV2; (c) схематическое представление положений праймеров, отображенных вдоль генома hPIV3.

2.2.5 Тест специфичности разработанных панелей праймеров

Специфичность каждого разработанного набора праймеров оценивали с использованием клинических образцов и положительных контролей для вирусов hPIV и других респираторных патогенов. Клинические образцы были получены из биобанка первичных респираторных материалов НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева и включали положительные образцы для hPIV1, hPIV2, hPIV3, hPIV4, а также других респираторных вирусов: вируса гриппа А (Inf A), вируса гриппа В (Inf B), риновируса (hRV), респираторно-синцитиального вируса (hRSV), коронавируса (hCoV), метапневмовируса (hMpV) и аденовируса (hAdV). Дополнительно в качестве положительных контролей использовали изоляты hPIV1, hPIV2 и hPIV3: hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023, Human parainfluenza virus 1 strain C35 (ATCC); hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023, Human parainfluenza virus 2 strain Greer (ATCC); hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023 и Human parainfluenza virus 3 strain C243 (ATCC). Амплификацию проводили в идентичных условиях с использованием каждого набора праймеров hPIV. Специфичность определяли отсутствием флуоресцентных сигналов для нецелевой вирусной РНК.

2.2.6 Аналитическая чувствительность разработанных панелей праймеров

Для определения аналитической чувствительности проводили десятикратные серийные разведения (\log_{10}) в среде α -MEM, содержащей изоляты hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023, hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023 и hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023, каждый с инфекционным титром 64 в неразведённом образце. Для оценки порогового значения Ct каждого набора праймеров разведения тестировали в трёх повторностях. Образцы на каждом уровне разведения первоначально исследовали методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиПрайм® ОРВИ-комплекс». Далее проводили полноразмерную амплификацию генома с применением разработанных наборов праймеров с контролем успешности реакции по анализу кривых плавления, после чего выполняли секвенирование на платформе Illumina NextSeq. Аналитическая чувствительность оценивалась в зависимости от показателя покрытия генома: покрытие генома $\geq 20\times$ (процент генома, покрытого прочтениями с глубиной не менее 20-кратного значения). Результаты секвенирования и покрытия генома были сопоставлены со значениями Ct для анализа пороговых значений чувствительности.

2.2.7 Тест робастности разработанных панелей праймеров

Для оценки робастности разработанных панелей праймеров использовали штаммы Human parainfluenza virus 1 strain C35 (ATCC), Human parainfluenza virus 2 strain Greer (ATCC) и Human parainfluenza virus 3 strain C243 (ATCC). Данные штаммы были выбраны ввиду их филогенетической удалённости от российских клинических образцов, что позволило подтвердить эффективность панелей праймеров при работе с генетически разнообразными вариантами вируса.

2.2.8 Полногеномная амплификация hPIV1, hPIV2 и hPIV3

Разработанные панели праймеров были протестированы на клинических образцах, содержащих РНК hPIV1–3, согласно данным скрининга с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL». Значения C_t использовались как показатель содержания вирусной РНК (вирусной нагрузки) в образцах. Образцы, положительные на hPIV и имеющие значения $C_t < 25$, считались пригодными для секвенирования; приоритет отдавался образцам, представляющим каждый эпидемический сезон для обеспечения временного охвата и имеющим достаточный объём для дальнейшей работы. Всего с использованием разработанных панелей праймеров было амплифицировано 184 образца hPIV1, 54 — hPIV2 и 510 — hPIV3. Для каждого образца парагриппа проводили две отдельные мультиплексные ПЦР-реакции (пулы 1 и 2) с использованием одношагового набора БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×) (Биолабмикс ®, Новосибирск, Россия) согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР выполняли при следующих условиях: стадия обратной транскрипции при 45 °С в течение 1 ч, предварительная денатурация при 93 °С в течение 5 мин, денатурация при 93 °С в течение 10 с, отжиг при 54 °С в течение 30 с для hPIV1 и hPIV2; отжиг при 52 °С в течение 30 с для hPIV3, элонгация при 68 °С в течение 4 мин (44 цикла амплификации) и финальная элонгация при 68 °С в течение 7 мин. Для оценки успешности амплификации использовали SYBR Green. Положительно амплифицированные ПЦР-продукты из реакций пулов 1 и 2 для одного образца объединяли и использовали для подготовки библиотек NGS.

2.2.9 Полногеномная амплификация hPIV4

В отличие от hPIV1–3, для которых были разработаны специализированные панели праймеров для ампликонного секвенирования, для hPIV4 данный подход не применялся. Это связано с тем, что hPIV4 представлен двумя генетически и антигенно различающимися подтипами

— hPIV4a и hPIV4b, при отсутствии предварительной информации о доминирующем подтипе в исследуемой популяции. В таких условиях разработка единой панели праймеров сопряжена с риском снижения эффективности амплификации вследствие возможных несовпадений праймеров с последовательностями различных подтипов. Разработка отдельных панелей для каждого подтипа также представлялась методологически неоптимальной, поскольку на этапе тестирования было бы затруднительно однозначно интерпретировать причины возможных неудач амплификации — как результат несовпадения праймеров или отсутствия соответствующего подтипа в образцах. В связи с этим для получения полных геномов hPIV4 был выбран метагеномный подход, основанный на технологии SMART-9N [173]. Данный метод позволяет осуществлять непредвзятую амплификацию вирусной РНК без необходимости предварительного знания последовательности генома.

Метод амплификации SMART-9N представляет собой модификацию подхода синтеза кДНК SMART (переключение матрицы на 5'-конце РНК) [172,173], в котором «9N» обозначает праймер, содержащий девять случайных нуклеотидов, инициирующий обратную транскрипцию и обеспечивающий непредвзятый захват случайных молекул РНК. Вкратце, синтез первой цепи кДНК проводился с использованием ревертазы M-MLV из набора «Обратная транскриптаза Magnus» (Евроген, Москва) в соответствии с инструкциями производителя, с праймером, содержащим 9N (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTNNNNNNNNN-3'), и олигонуклеотидом, переключающим матрицу (TSO) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACrGrGrG-3'), который добавляет определенную последовательность адаптера к 5'-концам кДНК во время обратной транскрипции. Это позволяет получить полноразмерную вирусную кДНК из 3'- или концевых областей РНК-матриц благодаря естественной активности фермента по переключению матрицы. Протокол обратной транскрипции был следующим: 25°C в течение 10 мин, 42°C в течение 3 часов, 85°C в течение 5 мин. После синтеза кДНК проводили синтез второй цепи и ПЦР-амплификацию с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (Биолабмикс ®, Новосибирск, Россия) и праймера SMART (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'). Протокол амплификации был следующим: 25°C в течение 2 мин, 95°C в течение 5 мин, затем 49 циклов по 94°C 15 сек, 62°C 15 сек и 68°C 4 мин 30 сек; затем 68°C 15 мин, кривая плавления от 75°C до 90°C.

2.2.10 Секвенирование hPIV

Подготовка библиотек ДНК для секвенирования проводилась в несколько этапов с использованием коммерческого набора для ПЦП MGI Easy Fast PCR-free FS DNA Library Prep Set (MGI Tech, Шэньчжэнь, Китай) в соответствии с инструкциями производителя с небольшими оптимизационными корректировками, которые включают увеличение времени фрагментации (25 мин против 7,5 мин в исходном протоколе), изменение соотношения шариков к ДНК для очистки продукта фрагментации ($1,2\times$ против $0,8\times$ в исходном протоколе) и увеличение времени лигирования адаптеров (17 мин против 10 мин в исходном протоколе). Исходный протокол подходит для режимов секвенирования PE100 и PE150, а поскольку мы используем режим SE100, мы вынуждены чередовать протоколы для получения более коротких библиотек ДНК (целевая длина библиотеки — 300 bp; длина вставки — 100–150 bp, длина адаптера — 132 bp). Полногеномное секвенирование проводилось с использованием платформы MGI DNB-SEQ G-400 (MGI Tech, Шэньчжэнь, Китай) в режиме однонаправленного чтения длиной 100 пар оснований. Кроме того, часть образцов была обработана с использованием набора Illumina DNA Prep kit (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) и секвенирована на платформе Illumina NextSeq 2000 в режиме парного чтения PE300.

2.2.11 Биоинформатический анализ данных

Для сборки консенсусных нуклеотидных последовательностей каждого анализируемого образца использовали программы BWA v0.7.17, Samtools v1.19.2 и Ivar v1.4.2, а также пользовательские скрипты на Python. В последующий анализ включали только консенсусные геномы с покрытием $\geq 95\%$ длины генома и медианной глубиной секвенирования $\geq 10\times$. Множественное выравнивание полных геномов выполняли с использованием программного обеспечения MAFFT с параметрами по умолчанию [218], реализованного в UGENE v53. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей проводили методом максимального правдоподобия (ML, модель GTR+G), реализованным в IQ-TREE v3.0.1. Поддержка ветвей оценивалась по 1000 бутстреп-репликатам. Полученные филогенетические деревья визуализировали с помощью FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Для каждого типа сначала была выполнена филогенетическая реконструкция с использованием полного глобального набора данных (все доступные последовательности GenBank вместе с

последовательностями, полученными в этом исследовании). Для облегчения аннотирования и улучшения визуальной интерпретируемости больших наборов данных мы применили инструмент Treemmer v0.3 [219] для удаления избыточных последовательностей с сохранением филогенетического разнообразия. Алгоритм Treemmer оценил избыточность глобальных филогенетических деревьев и уменьшил их сложность, удалив листья, вносящие наименьший вклад в общее разнообразие деревьев, что привело к формированию курированных подвыборок с широким временным и географическим охватом. Сокращение Treemmer применялось только к наборам данных, превышающим 250 последовательностей (hPIV1 и hPIV3). Каждый из этих наборов данных был сокращен до 200 репрезентативных геномов. Для hPIV2 и hPIV4 общее количество доступных последовательностей (~200 геномов) уже было пригодно для визуализации и последующего анализа; поэтому сокращение не проводилось. Курированные наборы данных впоследствии использовались для детальной филогенетической интерпретации, анализа генов HN и картирования мутаций, тогда как полные наборы данных были сохранены для глобального филогенетического контекста. Окончательная визуализация была выполнена с использованием пользовательских скриптов в R (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/hpiv3-molecular-diversity-russia-2023>, доступ осуществлен 5 мая 2026 г.).

Для оценки степени дивергенции рассчитывали средние попарные генетические расстояния (p-distance) в MEGA v11.0.13 [220]. Пороговые значения генетических расстояний определяли следующим образом: среднее генетическое расстояние $\geq 0,045$ использовали для выделения основных кластеров; значения 0,019–0,045 считали характерными для подкластеров; значения 0,010–0,019 определяли отдельные генетические линии, а значения $\leq 0,010$ интерпретировали как принадлежность последовательностей к одной линии [16].

Помимо полногеномного филогенетического анализа, для четырёх типов hPIV были построены тип-специфические филогенетические деревья максимального правдоподобия на основе полного гена HN с использованием RAxML (модель замещения GTR+G) в сочетании с TreeSub (<https://github.com/tamuri/treesub>). Филогенетические деревья, построенные на основе гена HN, были реконструированы с использованием тех же курированных наборов данных (для hPIV1 и hPIV3) и полных наборов данных (для hPIV2 и hPIV4) с целью обеспечения сопоставимого размера деревьев между типами. Данный интегрированный подход применяет реконструкцию предкового состояния (ASR) с использованием PAML для определения аминокислотных замен

вдоль отдельных ветвей, что позволяет идентифицировать и визуализировать аминокислотные изменения в белке HN и других вирусных белках, определяющие различные генетические группы.

Потенциальные сайты N-гликозилирования (Asn/X/Ser/Thr) в белке HN предсказывали с использованием сервера NetNGlyc (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>). Сайты с пороговым значением выше 0,5 считали гликозилированными.

Анализ рекомбинации в полногеномных последовательностях hPIV1-4 проводился с использованием нескольких алгоритмов из пакета программного обеспечения RDP v.5.64 [221], включая RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq, LARD и Phylpro. Для обеспечения достоверности результатов события рекомбинации считались действительными только в том случае, если они были обнаружены как минимум тремя из этих алгоритмов.

2.2.12 Выборка последовательностей для филогенетического анализа

Для проведения филогенетического анализа каждого типа hPIV референсные геномные последовательности hPIV1–4 были загружены из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с использованием следующих таксономических запросов: «Human respirovirus 1, taxid:12730», «Human Orthorubulavirus 2, taxid:2560525», «Human respirovirus 3, taxid:11216» и «Human Orthorubulavirus 4, taxid:2560526». В набор данных были включены прототипные штаммы JQ901971 и AF457102 (hPIV1), AF533012 (hPIV2), LC817393 и AB012132 (hPIV3), а также AB543336 (hPIV4a) и AB543337 (hPIV4b). Для анализа отбирались только практически полные геномные последовательности с минимальным количеством неопределённых нуклеотидов и без крупных внутренних разрывов. Всего было включено 352, 171, 1036 и 167 последовательности для hPIV1, hPIV2, hPIV3 и hPIV4 соответственно (Приложения А.2, В.2, С.2, D.2). Все последовательности были выровнены с использованием программы MAFFT версии 7.

2.2.13 Доступность данных

Номера доступа GenBank для нуклеотидных последовательностей, полученных в данном исследовании: hPIV1: PP477776; PP757764–PP757767; PP886675–PP886711; PX380241–PX380303. hPIV2: PP477777; PP737253–PP737254; PP886712–PP886722; PX378058–PX378081. hPIV3:

PX360730–PX361032. hPIV4: PX353455–PX353462. Подробности см. в приложениях A.1, B.1, C.1, D.1.

2.2.14 Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения R (версия 4.5.2) в среде RStudio (версия 2025.09.3+425). Для обобщения полученных данных применялись методы описательной статистики. Категориальные переменные (включая распределение острых респираторных вирусных инфекций, распределение по типам, сезонность и возрастные группы) представлялись в виде процентных долей. При необходимости рассчитывались 95% доверительные интервалы. Сравнение категориальных переменных проводилось с использованием критерия χ^2 (хи-квадрат) или точного критерия Фишера в зависимости от применимости. Анализ сезонной динамики осуществлялся на основе распределения частоты выявления вирусов по месяцам и эпидемическим сезонам. Для контроля ошибки множественных сравнений применялась поправка Бенджамини–Хохберга (Benjamini–Hochberg, BH) с контролем уровня ложных открытий (False Discovery Rate, FDR). Коррекция выполнялась независимо внутри каждой анализируемой группы вирусов. Статистически значимыми считались различия при скорректированном значении $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Распространенность вируса парагриппа человека

В период исследования с октября 2017 г. по сентябрь 2025 г. в рамках госпитального мониторинга в Санкт-Петербурге было проанализировано в общей сложности 24824 респираторных образца (выписка из протокола ЛЭК № 152 от 18.06.2020 г.). Вирусы парагриппа человека были обнаружены в 1645 образцах (из 14334 положительных на ОРВИ, что составляет 11,48%) (Рисунок 11). Наиболее часто выявлялся тип hPIV3 — 1217 случаев (74%), далее следовали hPIV1 — 207 случаев (13%), hPIV2 — 129 случаев (8%) и hPIV4 — 92 случаев (6%) (Рисунок 12). Одновременные инфекции более чем одним типом hPIV не наблюдались, однако ко-инфекции с другими респираторными вирусами встречались достаточно часто. Анализ сезонной заболеваемости в Санкт-Петербурге показал ежегодный пик hPIV в весенний период (46,2%) с последующим снижением в осенние месяцы, на которые приходилось около 12,2% от общего числа случаев. Более детальный анализ сезонного распределения по типам выявил различия в характере циркуляции вирусов (Рисунок 13). Для hPIV1 отмечалось максимальное распространение в осенний период, в то время как в зимние месяцы его циркуляция значительно снижалась. hPIV2 и hPIV4 преимущественно выявлялись зимой. В отличие от этого, hPIV3 характеризовался выраженным пиком в весенний период с сохранением высокой активности в летние месяцы, что согласуется с его доминирующей ролью в общей структуре циркуляции hPIV. Анализ возрастного распределения выявленных случаев показал, что возрастная структура существенно различалась между типами hPIV (Рисунок 14). Для hPIV1, hPIV2 и hPIV4 выявлялись преимущественно среди детей младшего возраста: наибольшая доля приходилась на группу 1–4 года (35% для hPIV1, 38% для hPIV2 и 32% для hPIV4). Для hPIV3, напротив, наблюдался выраженный сдвиг в сторону старших возрастных групп — на взрослых (18–64 лет, 32%) и лиц старшего возраста (≥ 65 лет, 28%) в совокупности приходилась большая часть выявлений.

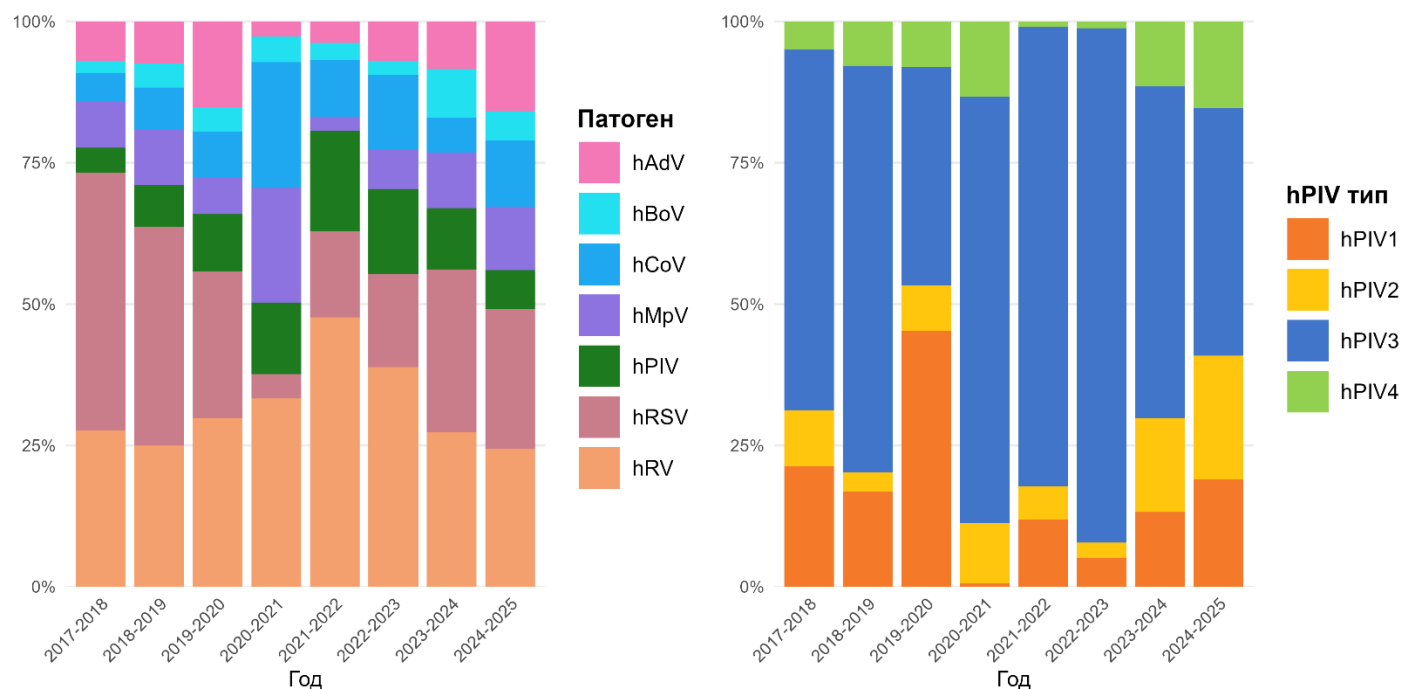


Рисунок 11. Эпидемиологический мониторинг острых респираторных вирусных инфекций в Санкт-Петербурге, 2017–2025 годы. Левая панель: Доля всех выявленных респираторных вирусов в исследуемый период; hAdV — аденовирус человека, hBoV — бокавирус человека, hCoV — сезонный коронавирус человека, hMPv — метапневмовирус человека, hPIV — вирус парагриппа человека, hRSV — респираторно-синцитиальный вирус человека, hRV — риновирус человека; данные по гриппу и SARS-CoV-2 были исключены из анализа, чтобы избежать искажения пропорционального представления и визуализации респираторных патогенов. Распределение, включающее вирусы гриппа и SARS-CoV-2, представлено на дополнительном рисунке П1 для эпидемиологического контекста. Правая панель: Доля четырех типов вируса парагриппа человека (hPIV1–4) в составе инфекций, вызванных hPIV.

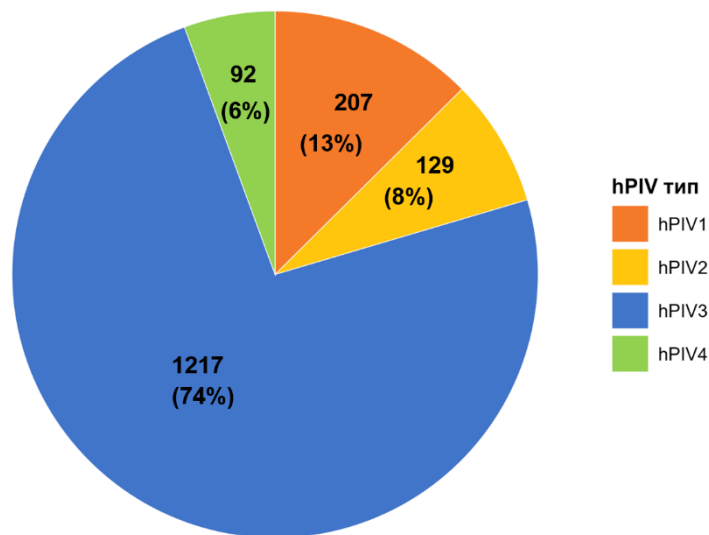


Рисунок 12. Распределение типов вируса парагриппа человека, обнаруженных в клинических респираторных образцах, собранных в Санкт-Петербурге в период наблюдения 2017–2025 гг. (n = 1645).

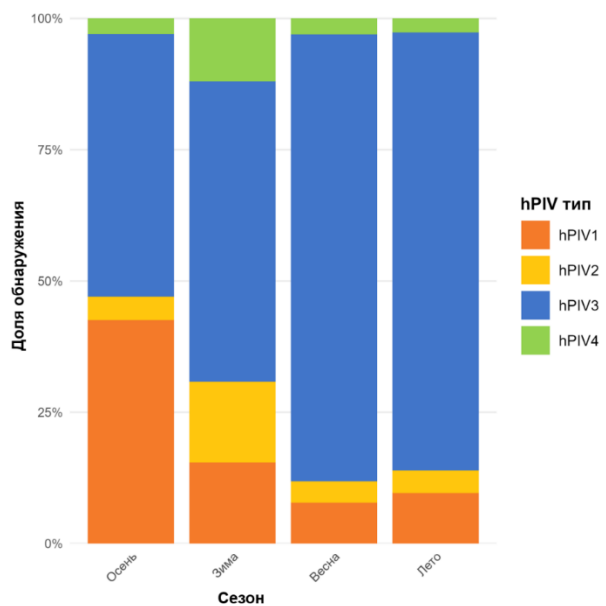


Рисунок 13. Сезонное распределение типов вируса парагриппа человека, выявленных в клинических образцах, собранных в Санкт-Петербурге в период наблюдения 2017–2025 гг.

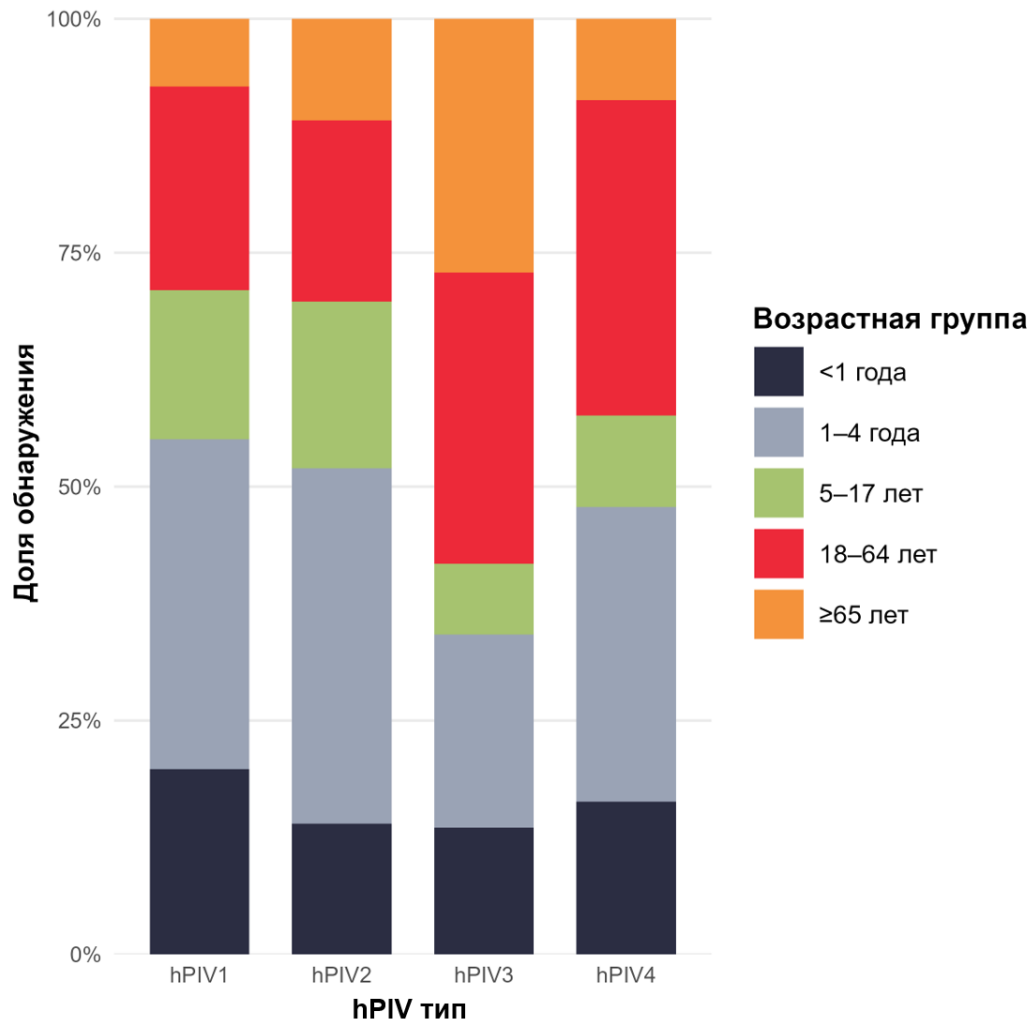


Рисунок 14. Распределение типов вируса парагриппа человека по возрастным группам в клинических респираторных образцах, собранных в Санкт-Петербурге в период 2017–2025 гг.

3.2 Выделение hPIV в клеточной культуре LLC-MK2 и MA-104

После выявления положительных образцов hPIV методом ОТ-ПЦР была отобрана подгруппа образцов с высокой вирусной нагрузкой для выделения вируса в клеточной культуре. В соответствии с дизайном исследования данный этап был направлен на отработку протокола выделения вируса для различных типов hPIV, а также на оценку возможного возникновения адаптационных изменений вируса в условиях клеточной культуры, одновременно обеспечивая получение инфекционных вирусных изолятов для последующих вирусологических исследований. Была обработана случайная подвыборка образцов, положительных по ОТ-ПЦР ($C_t < 25$), собранных в различные эпидемические сезоны. Всего 30 образцов hPIV1, 25 hPIV2, 30 hPIV3 и 25 hPIV4 были инокулированы на клетки LLC-MK2 и MA-104. Успешное выделение вируса было достигнуто для 26/30 (87%) образцов hPIV1, 10/25 (40%) hPIV2, 12/30 (40%) hPIV3 и 8/25 (32%) hPIV4. Цитопатическое действие (ЦПД) развивалось на 6–7 сутки после заражения для hPIV1–3, при этом ЦПД в культуре клеток MA-104 развивалось раньше по срокам - на 3–4 сутки. Наблюдаемый характер ЦПД для всех четырёх типов hPIV был сходным и включал округление клеток, образование синцитиев, прогрессирующее разрушение и отслоение монослоя (Рисунок 15a–d). Сводные результаты выделения вирусов, включая эффективность выделения и сроки развития ЦПД, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Основные характеристики выделения и вирусологических свойств изолятов hPIV1–4, полученных на клеточных культурах

hPIV тип	Количество инокулированных образцов (n)	Количество успешно выделенных изолятов (n, %)	Пассаж	ЦПД начало (день)
hPIV1	30	26 (87%)	2	6 – 7
hPIV2	25	10 (40%)	2	6 – 7
hPIV3	30	12 (40%)	2	5 – 7
hPIV4	25	8 (32%)	3	14 – 21

Реакция гемагглютинации (РГА), выполненная с использованием 0,5% эритроцитов морской свинки, показала титры 1:2–1:64 для hPIV1, 1:2–1:32 для hPIV2 и 1:8–1:128 для hPIV3; все культивируемые изоляты hPIV4 оказались отрицательными в реакции гемагглютинации в

используемых условиях (дополнительно для hPIV4 были использованы куриные и человеческие эритроциты).

Успешное выделение вирусов было подтверждено методом ОТ-ПЦР в реальном времени при исследовании культуральных супернатантов после пассирования с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производство ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Тогда как исходные клинические образцы имели значения C_t 15–22, после выделения вируса они значительно снижались (у большинства изолятов $C_t < 10$, у некоторых – $C_t=3–4$), что свидетельствует о продуктивной репликации. В таблице 5 представлены индивидуальные характеристики выделенных изолятов hPIV1–4, включая обратные титры гемагглютинации и значения C_t исходных клинических образцов и соответствующих культуральных изолятов после пассирования.

Таблица 5. Индивидуальные характеристики изолятов hPIV1–4, полученных на клеточных культурах: (a) hPIV1, (b) hPIV2, (c) hPIV3 и (d) hPIV4.

(a)				
№	Изолят	Титр РГА	C_t исходного материала	C_t изолята
1	hPIV1/Russia/SPE-RII-1045V/2022	4	22.3	9.32
2	hPIV1/Russia/SPE-RII-12076V/2023	4	13.4	7.86
3	hPIV1/Russia/SPE-RII-1502V/2022	16	20.9	9.12
4	hPIV1/Russia/SPE-RII-18720V/2023	2	16.6	9.88
5	hPIV1/Russia/SPE-RII-21580V/2022	4	14.7	7.57
6	hPIV1/Russia/SPE-RII-23200V/2022	2	15.1	8.61
7	hPIV1/Russia/SPE-RII-2126V/2022	16	22.02	6.65
8	hPIV1/Russia/SPE-RII-971V/2022	32	17.7	7.05
9	hPIV1/Russia/SPE-RII-1055V/2022	16	18.6	9.98
10	hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023	32	19.3	6.30
11	hPIV1/Russia/SPE-RII-82V/2019	8	15.7	7.11
12	hPIV1/Russia/SPE-RII-103V/2019	64	17.6	6.22
13	hPIV1/Russia/SPE-RII-115V/2019	64	13.3	5.14
14	hPIV1/Russia/SPE-RII-135V/2019	4	14.9	9.44
15	hPIV1/Russia/SPE-RII-192V/2019	4	14.6	8.97
16	hPIV1/Russia/SPE-RII-268V/2019	4	13.8	7.19
17	hPIV1/Russia/SPE-RII-4314V/2019	16	19.3	8.46
18	hPIV1/Russia/SPE-RII-5007V/2023	2	19.9	9.77
19	hPIV1/Russia/SPE-RII-39V/2019	4	13.9	8.50
20	hPIV1/Russia/SPE-RII-171V/2019	64	13.8	4.48
21	hPIV1/Russia/SPE-RII-367V/2019	4	18.6	9.35
22	hPIV1/Russia/SPE-RII-562V/2019	32	14.9	6.68

23	hPIV1/Russia/SPE-RII-1874V/2023	2	22.63	10.12
24	hPIV1/Russia/SPE-RII-600V/2018	4	15.3	8.14
25	hPIV1/Russia/SPE-RII-23998V/2022	2	17.8	9.67
26	hPIV1/Russia/SPE-RII-1187V/2020	2	12.8	8.11
(b)				
1	hPIV2/Russia/SPE-RII-109V/2018	4	14.6	9.14
2	hPIV2/Russia/SPE-RII-1178V/2020	4	15.2	9.10
3	hPIV2/Russia/SPE-RII-32966V/2021	16	22.6	10.1
4	hPIV2/Russia/SPE-RII-32991V/2021	8	20.1	10.40
5	hPIV2/Russia/SPE-RII-19012V/2023	2	17.1	8.65
6	hPIV2/Russia/SPE-RII-19044V/2023	2	16.9	9.9
7	hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023	32	17.4	7.78
8	hPIV2/Russia/SPE-RII-3681V/2018	8	18.4	8.98
9	hPIV2/Russia/SPE-RII-3898V/2018	4	21.1	9.31
10	hPIV2/Russia/SPE-RII-22784V/2023	2	21.2	9.45
(c)				
1	hPIV3/Russia/SPE-RII-478V/2022	8	22.4	7.63
2	hPIV3/Russia/SPE-RII-1048V/2022	128	17.5	3.64
3	hPIV3/Russia/SPE-RII-1423V/2022	16	22.9	5.18
4	hPIV3/Russia/SPE-RII-2678V/2022	64	17.9	3.55
5	hPIV3/Russia/SPE-RII-2983V/2022	64	17.5	3.45
6	hPIV3/Russia/SPE-RII-13884V/2023	8	16.2	7.10
7	hPIV3/Russia/SPE-RII-14278V/2023	16	18.8	6.30
8	hPIV3/Russia/SPE-RII-14814V/2023	64	17.3	3.04
9	hPIV3/Russia/SPE-RII-15276V/2023	32	17.3	9.3
10	hPIV3/Russia/SPE-RII-15362V/2023	64	20.7	4.02
11	hPIV3/Russia/SPE-RII-15564V/2023	128	18.9	3.33
12	hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023	32	14.3	7.61
(d)				
1	hPIV4/Russia/SPE-RII-1011V1/2018	-	17.7	7.12
2	hPIV4/Russia/SPE-RII-2697V1/2023	-	15.3	9.11
3	hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023	-	21.48	6.91
4	hPIV4/Russia/SPE-RII-21726V2/2023	-	14.8	8.92
5	hPIV4/Russia/SPE-RII-27084V1/2021	-	16.7	9.50
6	hPIV4/Russia/SPE-RII-1280V2/2023	-	19.81	7.30
7	hPIV4/Russia/SPE-RII-1011V2/2018	-	17.7	7.12
8	hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V2/2023	-	21.48	6.91

Была охарактеризована инфекционная активность типовых изолятов 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. Все четыре изолята вызывали ЦПД в клеточной культуре при серийных разведениях вирусосодержащего материала. Инфекционные титры составили 9,45 lg

TCID₅₀/мл для hPIV1, 8,95 lg TCID₅₀/мл для hPIV2, 9,95 lg TCID₅₀/мл для hPIV3 и 8,45 lg TCID₅₀/мл для hPIV4 (Таблица 6). Полученные результаты дополнительно подтверждают наличие инфекционно активного вируса в полученных культуральных изолятах.

Таблица 6. Инфекционная активность типовых изолятов hPIV1–4, определённая методом TCID₅₀

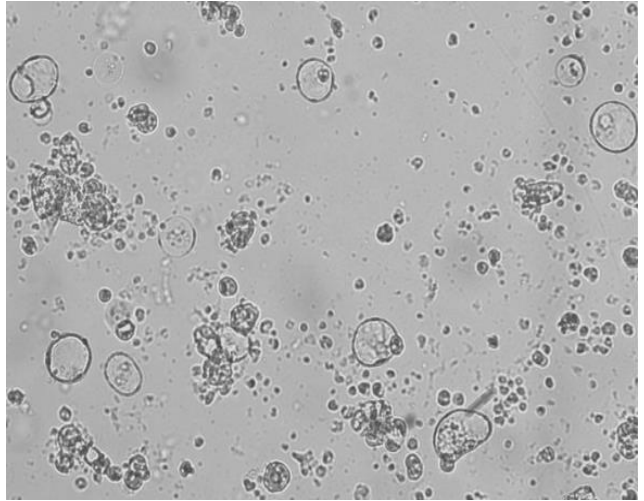
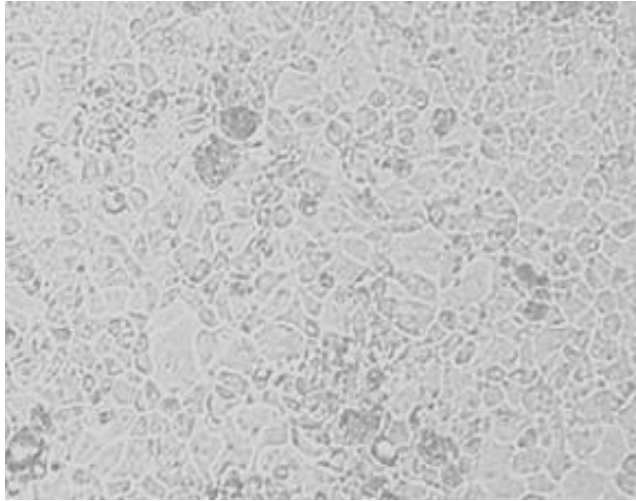
Вирусный изолят	Последнее разведение с ЦПД во всех повторах	ЦПД в следующем разведении	Инфекционный титр, lg TCID ₅₀ /мл
hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023	10 ⁻⁷	1/3 при 10 ⁻⁸	9,45
hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023	10 ⁻⁶	2/3 при 10 ⁻⁷	8,95
hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023	10 ⁻⁷	2/3 при 10 ⁻⁸	9,95
hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023	10 ⁻⁶	1/3 при 10 ⁻⁷	8,45

Результаты реакции торможения гемагглютинации (РТГА) показали, что крысиные поликлональные антисыворотки, полученные после иммунизации типовыми изолятами 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, имели значимые титры антигемагглютинирующих антител к гомологичным вирусам, варьирующиеся от 1:80 до 1:640 для hPIV1, hPIV2 и hPIV3 (Таблица 7). При этом незначительная перекрёстная реакция наблюдалась между hPIV1 и hPIV3, тогда как для hPIV2 гетерологичных реакций выявлено не было. Для hPIV4 провести РТГА было невозможно вследствие отсутствия гемагглютинирующей активности изолятов в используемых условиях эксперимента. В связи с этим активность антисыворотки к hPIV4 дополнительно оценивали в реакции нейтрализации вируса на клетках МА-104. Серийные двухкратные разведения крысиной поликлональной антисыворотки инкубировали с гомологичным изолятом hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023, после чего смесь вносили на монослой клеток МА-104 в 96-луночных планшетах. Результаты оценивали по подавлению развития цитопатического действия по сравнению с вирусным контролем. Антисыворотка подавляла развитие ЦПД, вызванного гомологичным вирусом, до разведения 1:320, что подтверждает наличие нейтрализующей активности и специфичность полученной антисыворотки.

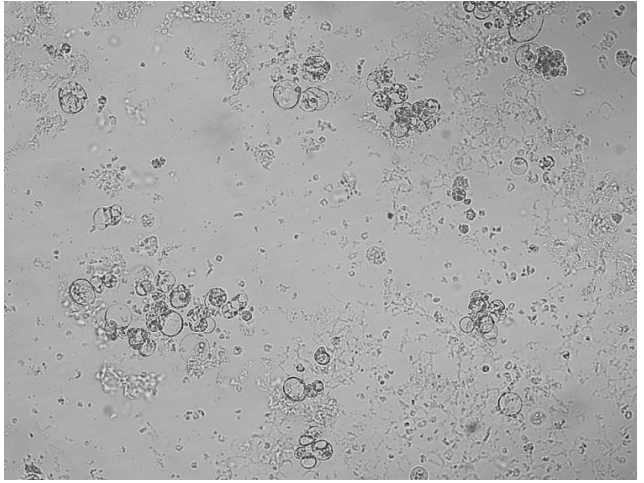
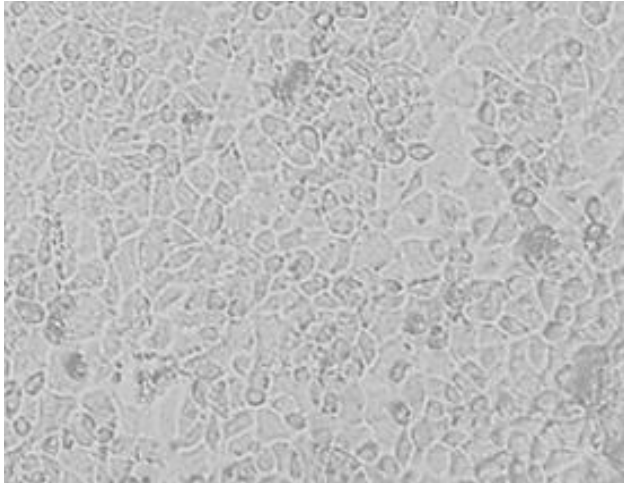
Таблица 7. Результаты реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием гомологичных и гетерологичных антисывороток к изолятам hPIV1–4

Поликлональные антисыворотки крыс				
Вирусный изолят	hPIV1/Russia/SPE -RII-18746V/2023	hPIV2/Russia/SPE -RII-17155V/2023	hPIV3/Russia/SPE -RII-15457V/2023	hPIV4/Russia/SPE -RII-1446V1/2023
hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023	1:320	<1:10	1:20	-
hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023	<1:10	1:80	<1:10	-
hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023	1:10	<1:10	1:640	-
hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023	-	-	-	-

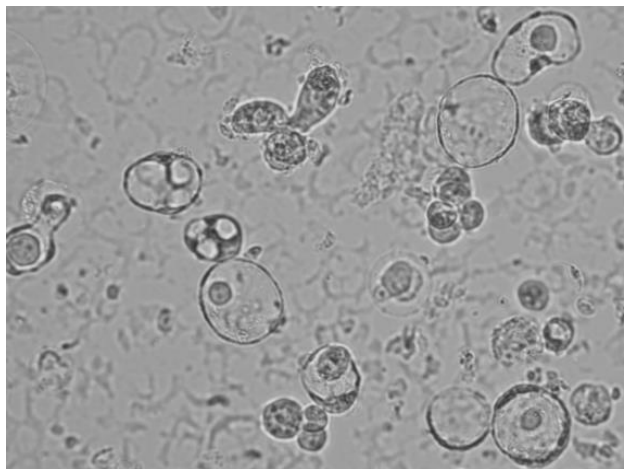
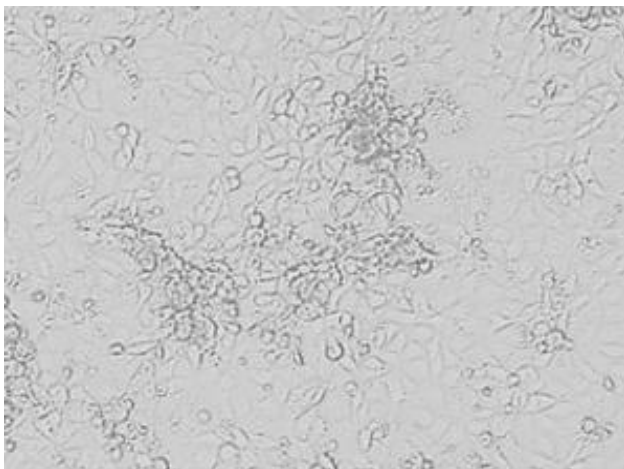
Все изоляты hPIV были депонированы в коллекцию вирусов гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. Штаммы hPIV1/Russia/SPE-RII-18746V/2023, hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023 и hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023, а также специфические крысиные поликлональные антисыворотки к указанным штаммам были депонированы в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации в качестве типовых штаммов для использования в будущих вирусологических, молекулярных и эпидемиологических исследованиях.



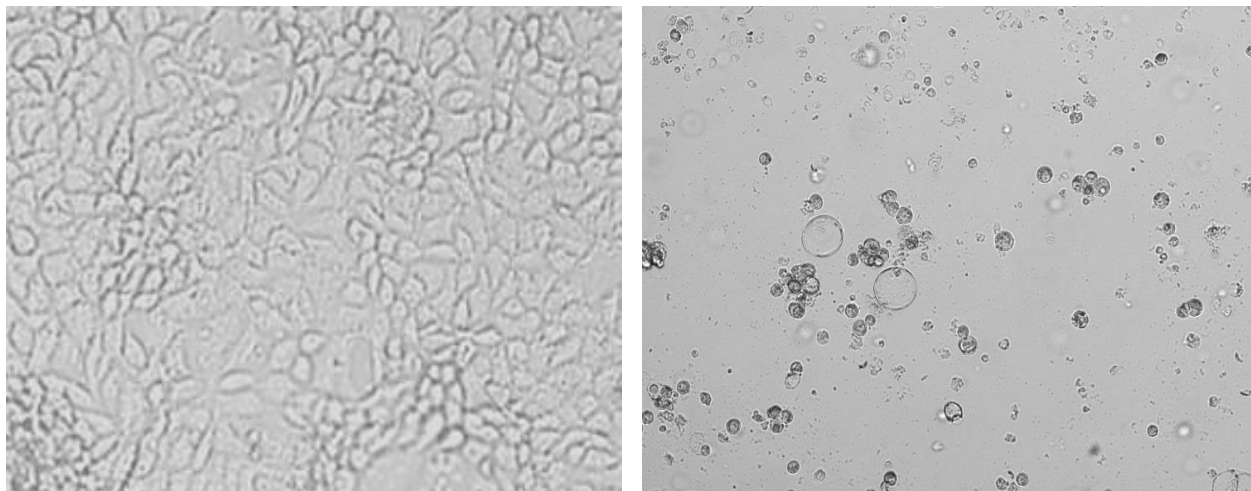
(a)



(b)



(c)



(d)

Рисунок 15. Микроскопические изображения клеток МА-104, инфицированных hPIV1-4; масштабная отрезка составляет 100 мкм: для каждого типа на левых панелях показаны отрицательные культуры без цитопатического действия. Частичное отслоение монослоя в этих контрольных образцах представляет собой неспецифические дегенеративные изменения, связанные с длительной инкубацией и процедурами промывания. На правых панелях показана положительная вирусная изоляция. Инфекция характеризовалась увеличением и округлением клеток, слиянием клеток с образованием синцития и прогрессирующим разрушением монослоя, приводящим к лизису: (a) hPIV1, (b) hPIV2, (c) hPIV3 и (d) hPIV4.

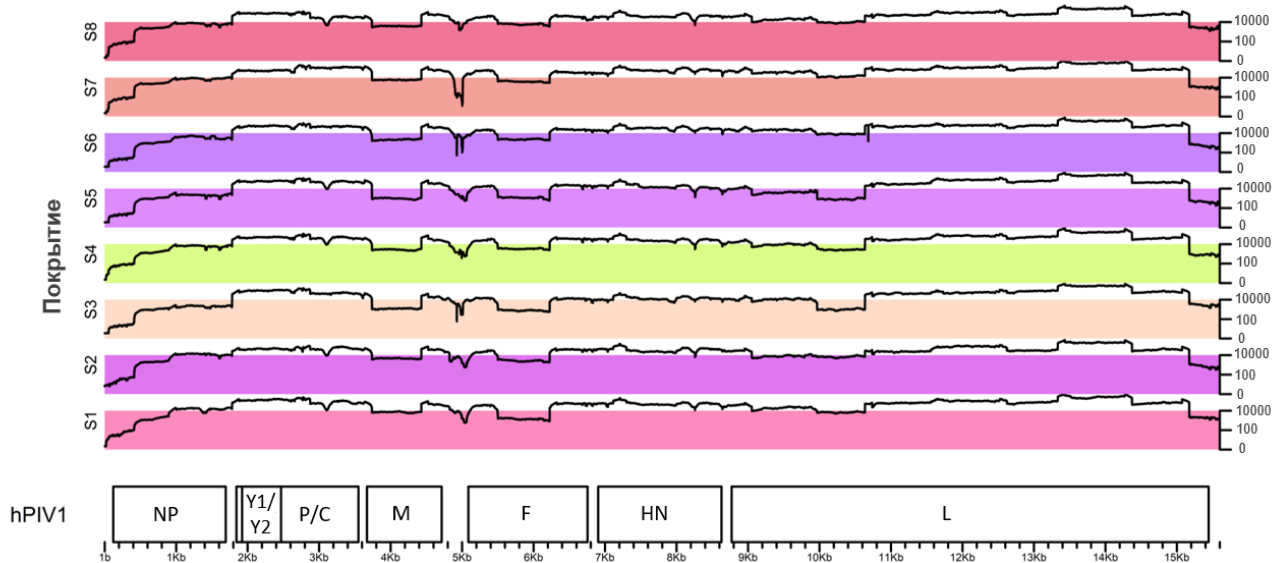
3.3 Разработка праймерной панели и её апробация на клинических образцах

Разработанные панели праймеров были протестированы на клинических образцах, содержащих РНК вируса парагриппа человека согласно данным скрининга с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL». Для тестирования были отобраны образцы с пороговым значением цикла (Ct) меньше 25. Дизайн набора ампликонов привел к равномерному покрытию каждой из последовательностей консенсусных геномов hPIV1, hPIV2 и hPIV3, что привело к получению высококачественных, полных последовательностей генома с минимальными пробелами в секвенировании (Рисунок 16 а-с). Как показано на Рисунке 9, покрытие распределено равномерно по всей длине геномов, включая как кодирующие, так и межгенные участки, без протяжённых областей с отсутствием прочтений, что свидетельствует о высокой эффективности дизайна ампликонов и непрерывности реконструкции геномных последовательностей. Средний размер ампликона составлял приблизительно 1 кб с перекрытием около 200 п.н. между соседними фрагментами, что обеспечивало непрерывную реконструкцию генома. Праймеры были

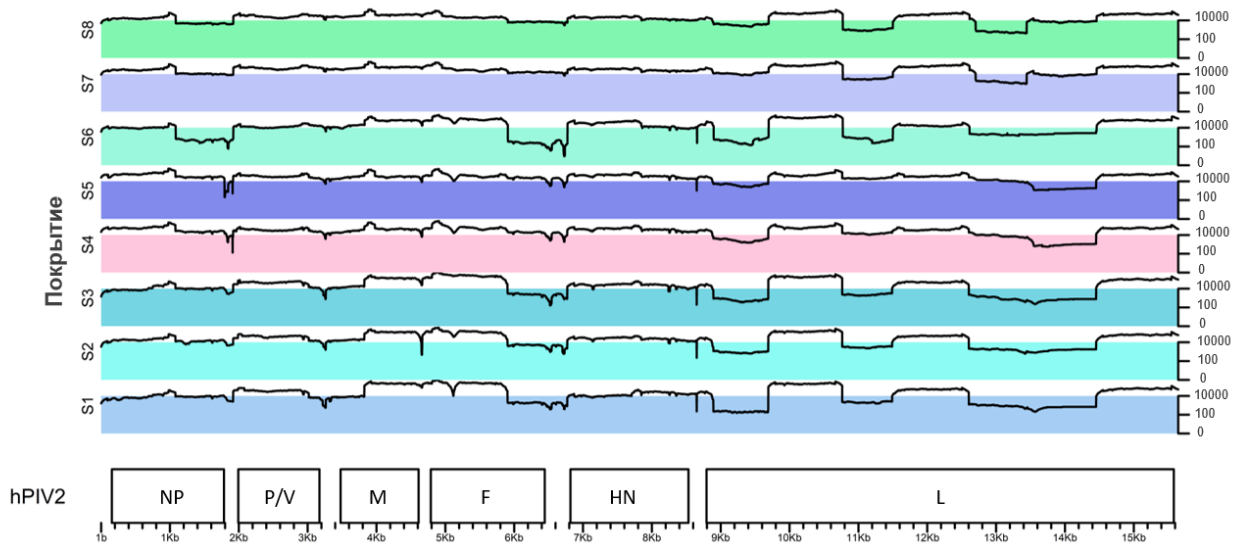
ориентированы на наиболее консервативные участки генома для максимизации специфичности и эффективности амплификации. Хотя в последовательности праймеров было включено ограниченное количество вырожденных нуклеотидов, они были специально добавлены для усиления связывания с различными штаммами вируса без ущерба для эффективности амплификации.

Эффективность разработанных панелей праймеров оценивалась с использованием следующих метрик секвенирования: процент картированных прочтений, процент генома, покрытого с минимальной глубиной $20\times$ (% мин $20\times$), позиции с нулевым покрытием и показатель Fold80, характеризующий равномерность покрытия. Процент картированных прочтений был стабильно высоким: в большинстве образцов примерно 95% прочтений были выровнены по референсным геномам. Даже при уровне выходных данных секвенирования около 300 тысяч прочтений на образец глубина покрытия была достаточной для получения надежных консенсусных последовательностей генома. Покрытие генома с глубиной $\geq 20\times$ приближалось к 100% для большинства образцов hPIV всех трех типов. Позиции без покрытия были редкими и составляли лишь незначительную долю генома. Анализ метрики $\log(\text{Fold80})$ показал, что для образцов с более высокими значениями C_t требовалась большая глубина секвенирования для поддержания сопоставимого покрытия генома.

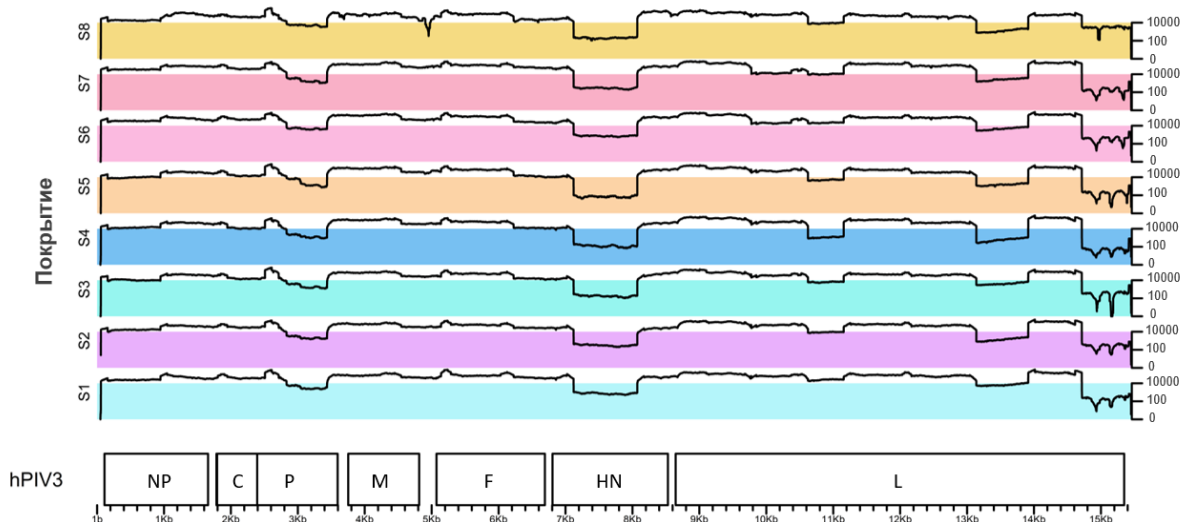
В ходе исследования было впервые получено 105 полных геномных последовательностей вируса парагриппа человека 1-го типа, 37 геномов — вируса парагриппа человека 2-го типа и 303 генома — вируса парагриппа человека 3-го типа из России. Амплификация части образцов не удалась, вероятнее всего, из-за деградации РНК или низкого количества РНК. В целом, разработанные в этом исследовании панели праймеров позволили эффективно получить практически полные геномы, пригодные для последующего молекулярного и филогенетического анализа, и могут быть использованы в рамках геномного надзора за возбудителями ОРВИ.



(a)



(b)



(c)

Рисунок 16. Графики покрытия геномов hPIV, созданные с помощью скрипта VizCoV в среде RStudio (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>): (a) график покрытия, представляющий восемь образцов hPIV1 после секвенирования; (b) график покрытия, представляющий восемь образцов hPIV2 после секвенирования; (c) график покрытия, представляющий восемь образцов hPIV3 после секвенирования. Обозначение «S» соответствует отдельным образцам (Sample). Глубина покрытия представлена в логарифмическом масштабе (\log_{10}), что позволяет визуализировать диапазон значений покрытия по всему геному.

3.4 Тест на специфичность разработанных панелей праймеров

Панели праймеров для hPIV1, hPIV2 и hPIV3 продемонстрировали высокую специфичность. Сигналы амплификации были обнаружены исключительно для мишеней hPIV1, hPIV2 и hPIV3 и их соответствующих положительных контролей, что подтверждает заявленную специфичность панелей. Перекрестной реактивности с другими типами hPIV и/или нецелевыми респираторными патогенами (например, Inf A, Inf B, hRV, hRSV, hCoV, hMPV и hAdV) не наблюдалось (Таблица 8). Эти результаты подтверждают высокую аналитическую специфичность панелей праймеров hPIV1, hPIV2 и hPIV3, обеспечивая надежное обнаружение и дифференциацию каждого вируса без помех со стороны других респираторных патогенов.

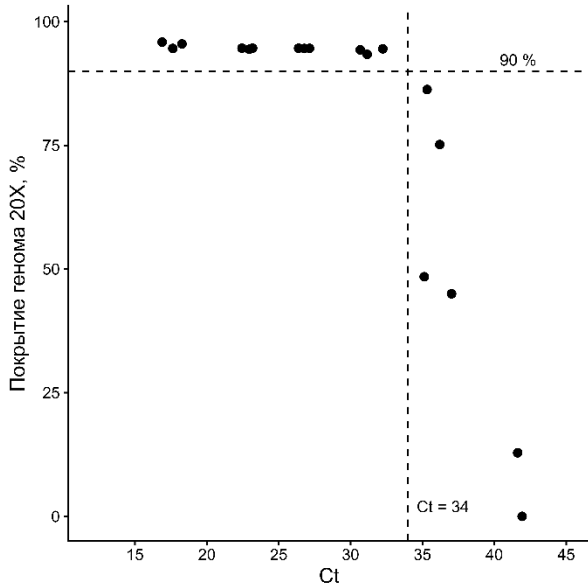
Таблица 8. Аналитическая специфичность панелей праймеров hPIV1, hPIV2 и hPIV3.

Образец	Панель праймеров hPIV1	Панель праймеров hPIV2	Панель праймеров hPIV3
hPIV1	+	–	–
hPIV2	–	+	–
hPIV3	–	–	+
hPIV4	–	–	–
Inf A	–	–	–
Inf B	–	–	–
hRV	–	–	–
hRSV	–	–	–
hCoV	–	–	–
hMpV	–	–	–
hAdV	–	–	–
hPIV1/Russia/SPE-R11-18746V/2023	+	–	–
hPIV2/Russia/SPE-R11-17155V/2023	–	+	–
hPIV3/Russia/SPE-R11-15457V/2023	–	–	+
Human parainfluenza 1 virus strain C35 (ATCC)	+	–	–
Human parainfluenza 2 virus strain: Greer (ATCC)	–	+	–
Human parainfluenza 3 virus strain: C243 (ATCC)	–	–	+

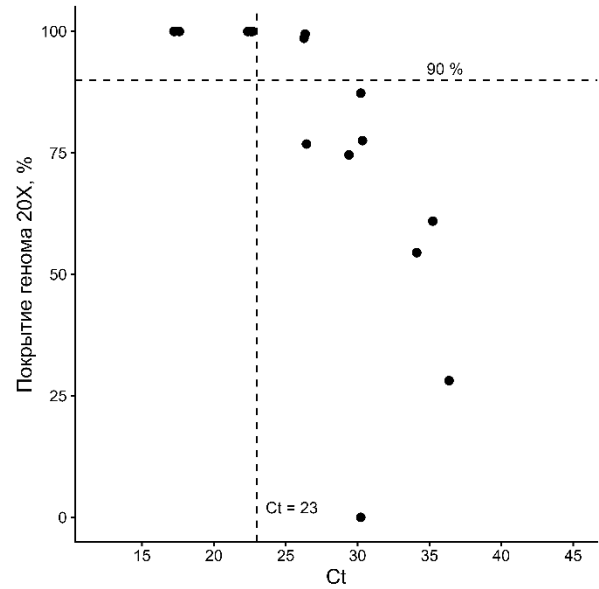
+ Обнаружена сигнал амплификации, – сигнал амплификации не обнаружена

3.5 Аналитическая чувствительность разработанных панелей праймеров

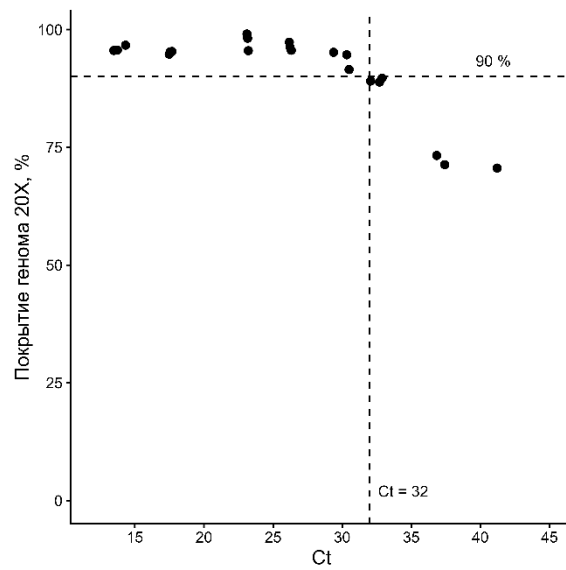
Аналитическая чувствительность панелей праймеров была оценена для всех серий разведений hPIV1/Russia/SPE-R11-18746V/2023, hPIV2/Russia/SPE-R11-17155V/2023 и hPIV3/Russia/SPE-R11-15457V/2023 на основе значений Ct, полученных в ходе ПЦР в реальном времени, и покрытия генома, достигнутого в процессе секвенирования. При значении Ct ниже 34 все образцы hPIV1 достигли более 90% покрытия генома при минимальной глубине 20× (Рисунок 17а). Покрытие генома значительно снижалось для образцов со значениями Ct, превышающими 34, при этом для образцов с Ct > 38 покрытие отсутствовало. Для hPIV2 покрытие генома оставалось выше 90% при Ct ≤ 23, что указывает на более узкий диапазон для высококачественного секвенирования по сравнению с hPIV1 (Рисунок 17б). Для hPIV3 покрытие генома оставалось выше 90% при Ct ≤ 32, что указывает на более широкий диапазон значений Ct, пригодных для высококачественного секвенирования, по сравнению с hPIV1 и hPIV2 (Рисунок 17с). Эти результаты показывают, что чувствительность панелей праймеров тесно связана со значениями Ct, при этом пороговые значения Ct 34 для hPIV1, 23 для hPIV2 и 32 для hPIV3 являются критически важными для достижения высокого покрытия генома во время секвенирования.



(a)



(b)



(c)

Рисунок 17. Диаграммы рассеяния, показывающие оценку чувствительности панелей праймеров серий разведений изолятов hPIV1, hPIV2 и hPIV3 путем оценки параметров секвенирования в зависимости от значений Ct: (a,b,c) диаграммы рассеяния минимального покрытия при глубине 20× в зависимости от значений Ct для hPIV1, hPIV2 и hPIV3 соответственно.

3.6 Тест робастности разработанных панелей праймеров

Типовые штаммы, полученные из коллекции Американской типовой коллекции клеточных культур ATCC – C35, Greer и C243 показали положительную амплификацию с использованием соответствующих разработанных панелей праймеров и были успешно секвенированы (Рисунок 18). Эти результаты показывают, что панели праймеров являются надежными и эффективными для полногеномного секвенирования парагриппозных вирусов 1-3 типов, в том числе - филогенетически отдаленных штаммов.

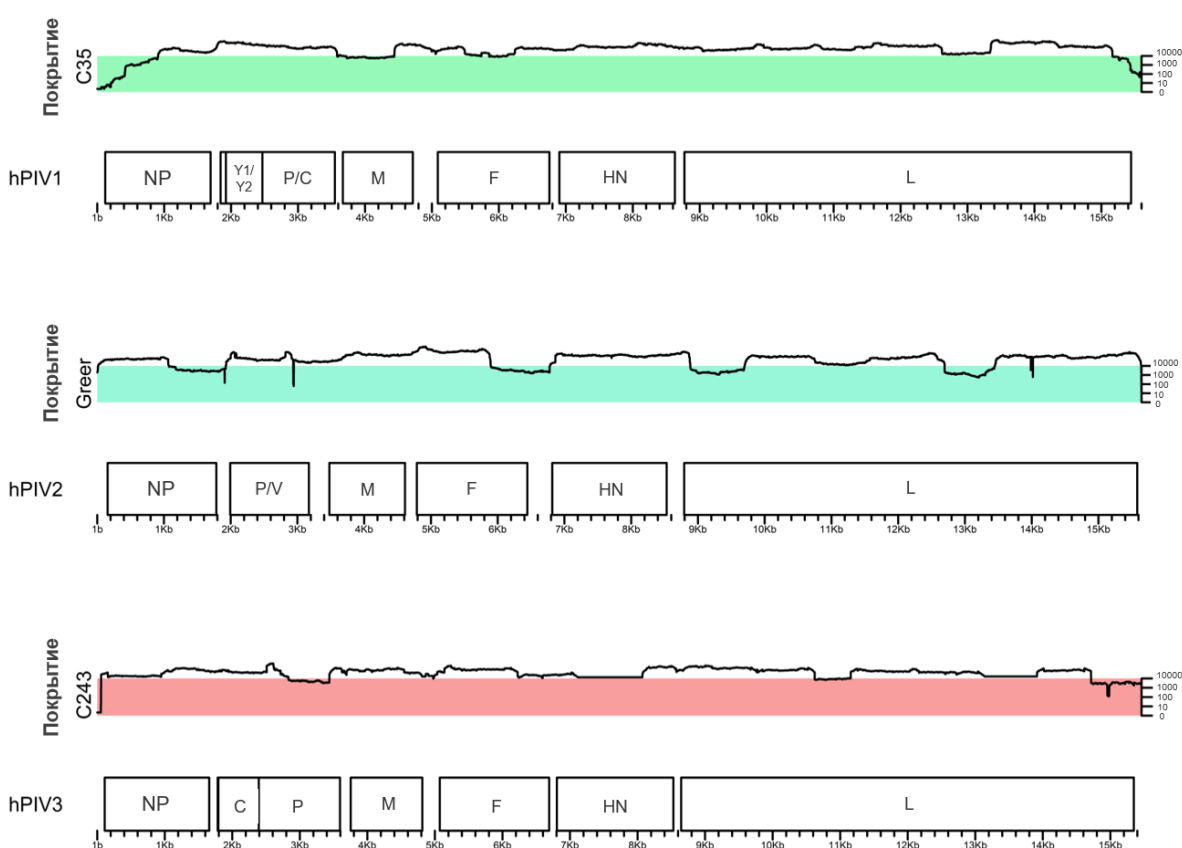


Рисунок 18. Графики покрытия геномов референсных штаммов hPIV1 (C35), hPIV2 (Greer) и hPIV3 (C243), полученные при секвенировании с использованием разработанных панелей праймеров. Графики покрытия построены с помощью скрипта VizCoV в среде RStudio (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>). Глубина покрытия представлена в логарифмическом масштабе (\log_{10}).

3.7 Амплификация всего генома hPIV4 с использованием амплификации SMART-9N

В отличие от подхода, применённого для hPIV1–3, геномы hPIV4 были реконструированы с использованием метагеномной амплификации SMART-9N. Выбор данного подхода обусловлен генетической гетерогенностью hPIV4, представленного подтипами hPIV4a и hPIV4b, при отсутствии предварительной информации о том, какой из подтипов циркулирует в исследуемой выборке. Это исключало возможность разработки универсальной ампликонной панели без риска снижения эффективности амплификации и обосновывало использование непредвзятого метагеномного подхода.

Полные геномные последовательности были успешно получены для всех восьми изолятов hPIV4. Полное покрытие генома было получено для каждого изолята без непокрытых участков по всему вирусному геному (Рисунок 19). Анализ покрытия показал равномерное распределение прочтений секвенирования как по структурным, так и по неструктурным генам. Медианная глубина покрытия, варьирувавшая от $62\times$ до $1306,5\times$ среди исследованных изолятов, была достаточной для получения высококачественных консенсусных геномных последовательностей. Более 90% позиций генома были покрыты с глубиной $\geq 20\times$, и не было обнаружено позиций с нулевым покрытием. Систематического снижения покрытия на концах генома или внутри кодирующих областей не наблюдалось, что указывает на стабильное и непредвзятое восстановление генома. Эти результаты демонстрируют, что амплификация SMART-9N обеспечивает надежную реконструкцию полных геномов hPIV4, пригодных для последующего молекулярного и филогенетического анализа.

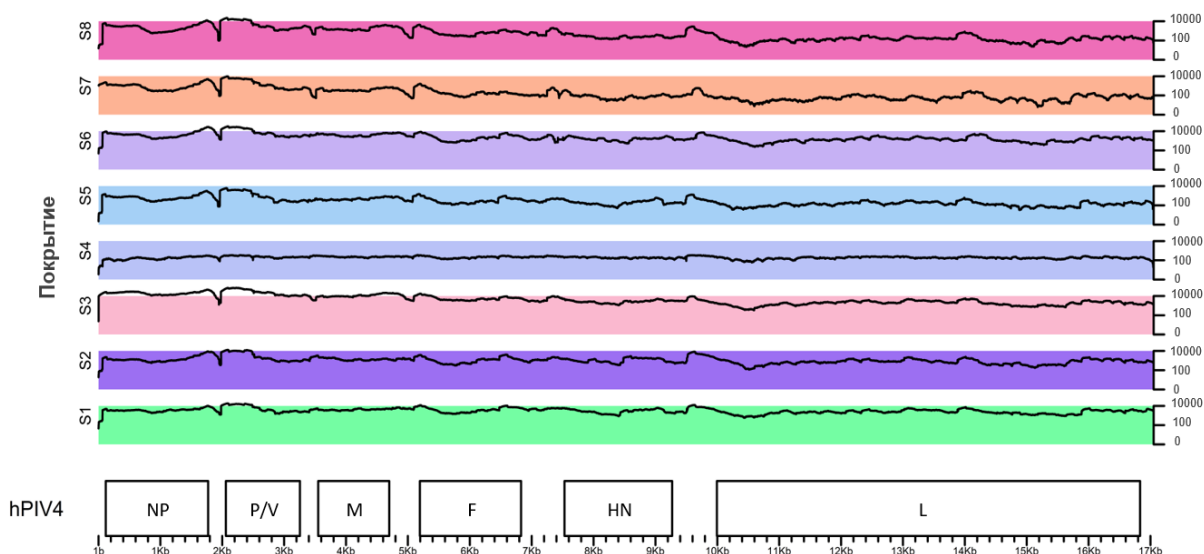


Рисунок 19. Графики покрытия геномов hPIV4, созданные с помощью скрипта VizCoV в среде RStudio (<https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>). Обозначение «S» соответствует отдельным образцам (Sample). Глубина покрытия представлена в логарифмическом масштабе (\log_{10}), что позволяет визуализировать диапазон значений покрытия по всему геному.

3.8 Сравнение последовательностей hPIV из клинических образцов и выделенных из них культивированных изолятов

Для оценки возможного возникновения мутаций адаптации к клеточной культуре было проведено сравнение полногеномных консенсусных последовательностей, полученных из исходных клинических образцов, с соответствующими последовательностями 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 (Таблица 9).

Нуклеотидные различия между клиническими образцами и соответствующими изолятами были выявлены во всех исследованных парах. Однако число обнаруженных замен оставалось небольшим и варьировало от 1 до 6 нуклеотидных замен на геном. Большинство выявленных различий являлись синонимичными и не приводили к изменению аминокислотной последовательности вирусных белков.

Несинонимичные замены были выявлены только в части исследованных образцов. Для hPIV1 аминокислотные замены были обнаружены в 8 из 20 пар и затрагивали белки P, HN и L. Всего было выявлено 10 аминокислотных замен, включая K275N в белке P, A45V, V73L, K514E, G524E, K541N и N551S в белке HN, а также I8T, I93V и V93I в белке L. Для hPIV2 несинонимичные замены были выявлены только в двух парах образцов и включали замены S121R в белке M и M1556I в белке L. Для hPIV3 аминокислотные изменения были обнаружены в шести парах и включали замены D15E и A560T в белке P, H262N в белке HN, а также G374A, G1498A и N1757S в белке L. Следует отметить, что выявленные аминокислотные замены носили спорадический характер и не формировали повторяющихся паттернов между независимыми изолятами. Ни одна из обнаруженных замен не была выявлена одновременно в нескольких образцах одного типа, что свидетельствует об отсутствии общих направлений адаптации вирусов к используемым клеточным культурам в условиях краткосрочного пассирования.

Таким образом, проведённый анализ показал высокую степень генетического сходства между клиническими образцами и соответствующими культивированными изолятами. Полученные результаты указывают на отсутствие выраженной геномной дивергенции при краткосрочном пассировании hPIV в клеточной культуре и подтверждают возможность использования полученных последовательностей культивированных изолятов для дальнейших филогенетических и молекулярно-эпидемиологических исследований.

Таблица 9. Несинонимичные аминокислотные различия между клиническими образцами и соответствующими культивированными изолятами после второго пассажа (a) hPIV1; (b) hPIV2; (c) hPIV3

(a)				
Пара	Клинический образец (номер доступа в GenBank)	Изолят (номер доступа в GenBank)	Ген	Несинонимичные аминокислотные замены
1	hPIV1/Russia/SPE-R11-600S/2018 (PP886675)	hPIV1/Russia/SPE-R11-600V/2018 (PX380270)		-
2	hPIV1/Russia/SPE-R11-4314S/2019 (PP886678)	hPIV1/Russia/SPE-R11-4314V/2019 (PX380263)		-
3	hPIV1/Russia/SPE-R11-39S/2019 (PP886680)	hPIV1/Russia/SPE-R11-39V/2019 (PX380265)	HN	K514E
4	hPIV1/Russia/SPE-R11-82S/2019 (PP886681)	hPIV1/Russia/SPE-R11-82V/2019 (PX380257)		-
5	hPIV1/Russia/SPE-R11-103S/2019 (PP886684)	hPIV1/Russia/SPE-R11-103V/2019 (PX380258)	L	I93V

6	hPIV1/Russia/SPE-RII-115S/2019 (PP886685)	hPIV1/Russia/SPE-RII-115V/2019 (PX380259)	HN	A45V
7	hPIV1/Russia/SPE-RII-135S/2019 (PP886686)	hPIV1/Russia/SPE-RII-135V/2019 (PX380260)		-
8	hPIV1/Russia/SPE-RII-171S/2019 (PP886687)	hPIV1/Russia/SPE-RII-171V/2019 (PX380266)		-
9	hPIV1/Russia/SPE-RII-192S/2019 (PP886688)	hPIV1/Russia/SPE-RII-192V/2019 (PX380261)	L	18T, V93I
10	hPIV1/Russia/SPE-RII-268S/2019 (PP886691)	hPIV1/Russia/SPE-RII-268V/2019 (PX380262)		-
11	hPIV1/Russia/SPE-RII-367S/2019 (PP886693)	hPIV1/Russia/SPE-RII-367V/2019 (PX380267)		-
12	hPIV1/Russia/SPE-RII-562S/2019 (PP886695)	hPIV1/Russia/SPE-RII-562V/2019 (PX380268)		-
13	hPIV1/Russia/SPE-RII-1187S/2020 (PP886696)	hPIV1/Russia/SPE-RII-1187V/2020 (PX380284)	HN	V73L, K541N
14	hPIV1/Russia/SPE-RII-23200S/2022 (PP886701)	hPIV1/Russia/SPE-RII-23200V/2022 (PX380246)		-
15	hPIV1/Russia/SPE-RII-23998S/2022 (PP886702)	hPIV1/Russia/SPE-RII-23998V/2022 (PX380271)		-
16	hPIV1/Russia/SPE-RII-971S/2022 (PP886707)	hPIV1/Russia/SPE-RII-971V/2022 (PX380248)	P	K275N
17	hPIV1/Russia/SPE-RII-1502S/2022 (PP886708)	hPIV1/Russia/SPE-RII-1502V/2022 (PX380243)	HN	G524E
18	hPIV1/Russia/SPE-RII-12076S/2023 (PP886709)	hPIV1/Russia/SPE-RII-12076V/2023 (PX380242)		-
19	hPIV1/Russia/SPE-RII-1874S/2023 (PP757764)	hPIV1/Russia/SPE-RII-1874V/2023 (PX380269)	HN	N551S
20	hPIV1/Russia/SPE-RII-5007S/2023 (PP757765)	hPIV1/Russia/SPE-RII-5007V/2023 (PX380264)		-
(b)				
1	hPIV2/Russia/SPE-RII-3681S/2018 (PP886712)	hPIV2/Russia/SPE-RII-3681V/2018 (PX378067)	M	S121R
2	hPIV2/Russia/SPE-RII-3898S/2018 (PP886713)	hPIV2/Russia/SPE-RII-3898V/2018 (PX378068)		-
3	hPIV2/Russia/SPE-RII-109S/2018 (PP886714)	hPIV2/Russia/SPE-RII-109V/2018 (PX378058)	L	M1556I
4	hPIV2/Russia/SPE-RII-1178S/2020 (PP886715)	hPIV2/Russia/SPE-RII-1178V/2020 (PX378059)		-
5	hPIV2/Russia/SPE-RII-17155S/2023 (PP886719)	hPIV2/Russia/SPE-RII-17155V/2023 (PX378066)		-
6	hPIV2/Russia/SPE-RII-19044S/2023 (PP886720)	hPIV2/Russia/SPE-RII-19044V/2023 (PX378063)		-
7	hPIV2/Russia/SPE-RII-22784S/2023 (PP886722)	hPIV2/Russia/SPE-RII-22784V/2023 (PX378069)		-
(c)				
1	hPIV3/Russia/SPE-RII-478S/2022 (PX360876)	hPIV3/Russia/SPE-RII-478V/2022 (PX361011)		-
2	hPIV3/Russia/SPE-RII-1048S/2022 (PX360877)	hPIV3/Russia/SPE-RII-1048V/2022 (PX361012)	L	G374A
3	hPIV3/Russia/SPE-RII-2678S/2022 (PX360878)	hPIV3/Russia/SPE-RII-2678V/2022 (PX361014)	P	A560T

4	hPIV3/Russia/SPE-RII-13884S/2023 (PX360880)	hPIV3/Russia/SPE-RII-13884V/2023 (PX361016)	P	D15E
5	hPIV3/Russia/SPE-RII-14814S/2023 (PX360881)	hPIV3/Russia/SPE-RII-14814V/2023 (PX361018)	L	G1498A
6	hPIV3/Russia/SPE-RII-15276S/2023 (PX360882)	hPIV3/Russia/SPE-RII-15276V/2023 (PX361019)	L	N1757S
7	hPIV3/Russia/SPE-RII-15362S/2023 (PX360883)	hPIV3/Russia/SPE-RII-15362V/2023 (PX361020)		-
8	hPIV3/Russia/SPE-RII-15457S/2023 (PX360884)	hPIV3/Russia/SPE-RII-15457V/2023 (PX361031)		-
9	hPIV3/Russia/SPE-RII-15564S/2023 (PX360885)	hPIV3/Russia/SPE-RII-15564V/2023 (PX361021)	HN	H262N

3.9 Филогенетический анализ на основе всего генома

Филогенетический анализ был проведён для всех четырёх типов вируса парагриппа человека с использованием как полных геномных последовательностей, так и кодирующей области гена HN, с целью более полного изучения и характеристики их эволюционных взаимоотношений. Для каждого типа филогенетические деревья первоначально строились с использованием полного набора доступных последовательностей в Genbank, что позволило расширить представления о структурном сходстве и отличиях в геноме hPIV, циркулирующих в разных странах мира. Для наиболее крупных наборов данных (hPIV1 и hPIV3) избыточные последовательности были впоследствии удалены с целью формирования репрезентативных подвыборок, что позволило обеспечить более детальную интерпретацию результатов и повысить наглядность визуализации филогенетических связей.

Интерпретация полученных филогенетических деревьев проводилась в контексте филогенетических групп, ранее описанных в литературе для hPIV. Анализ филогенетической структуры проводился на основе топологии дерева (формирования монофилетических кластеров), пороговых значений генетических расстояний и значений бутстреп-поддержки [16,18,188]. Для описания наблюдаемых групп использовались ранее предложенные обозначения кластеров, подкластеров, клайдов и генетических линий.

3.9.1 Филогенетический анализ hPIV1

Филогенетический анализ 105 полногеномных последовательностей hPIV1, полученных в настоящем исследовании (Приложение А.1), совместно с 352 штаммами, загруженными из базы данных NCBI GenBank (Приложение А.2), сформировал объединённый набор из 457 геномов (Рисунок 20) (Приложение А.3). В связи с большим объёмом набора данных был применён инструмент TreeKmer для формирования курируемой подвыборки из 200 репрезентативных последовательностей, сохраняющих общее филогенетическое разнообразие и глобальное географическое представительство полного набора данных, что позволило упростить визуализацию дерева и аннотирование аминокислотных замен (Приложение А.4).

Филогенетическое дерево, построенное на основе полногеномных последовательностей методом максимального правдоподобия, продемонстрировало, что вирусы hPIV1 группируются в четыре основные филогенетические клайды, обозначенные А–D (Рисунок 21). Разделение данных клайдов было подтверждено бутстреп-анализом, при этом большинство основных внутренних узлов дерева характеризовались значениями бутстреп-поддержки выше 70%. Средние генетические расстояния между выделенными клайдами варьировали от 0.0207 до 0.0387 (Таблица 10).

Таблица 10. Оценки генетических расстояний между четырьмя филогенетическими клайдами hPIV1

	A	B	C	D
A				
B	0.0207			
C	0.0247	0.0342		
D	0.0254	0.0228	0.0387	

Клайд А включает девять штаммов из США, выявленных в конце 1990-х годов, и представляет раннюю филогенетическую ветвь в пределах анализируемой популяции hPIV1.

Клайд В объединяет штаммы из различных географических регионов, включая США, Мексику, Францию, Южную Африку, Кению, Вьетнам, Таиланд, Нидерланды, Китай, Японию, Швейцарию и Россию. Девять российских штаммов, выявленных в 2018–2020 гг., группируются в пределах клайда В совместно со штаммами, ранее выявленными в США и Китае.

Клайд С представляет наиболее многочисленную и генетически разнообразную группу и включает большинство штаммов hPIV1, циркулировавших в период данного исследования. Вирусы, относящиеся к клайду С, выявляются в различных странах мира, включая США, Китай, Францию, Южную Африку, Японию, Вьетнам, Аргентину и Россию. В пределах клайда С выделяются две основные генетические линии, обозначенные С1 и С2. Линия С1 объединяет семь российских штаммов, а также десять штаммов из США и один штамм из Китая. Линия С2 включает большинство российских штаммов настоящего исследования и формирует филогенетическую группу совместно со штаммами из США и Японии. Среднее генетическое расстояние между линиями С1 и С2 составляет 0.0135, тогда как средние генетические расстояния внутри линий составили 0.009 и 0.008 соответственно.

Клайд D представлен штаммами из России, США и Китая. Этот клайд подразделяется на две генетические линии, обозначенные D1 и D2. Линия D1 представлена семью штаммами из Китая, тогда как линия D2 объединяет пять российских штаммов, выявленных в 2023 году, а также два штамма из США. Среднее нуклеотидное расхождение между линиями D1 и D2 составляет 0.0137, тогда как средние генетические расстояния внутри линий составили 0.010 и 0.008 соответственно.

Дополнительно для основных филогенетических клайдов и генетических линий hPIV1 были определены характерные аминокислотные замены, общие для большинства последовательностей внутри соответствующих филогенетических групп (Таблица 11a,b). Наибольшее число групп-специфичных замен выявлялось в генах Р, HN и L, тогда как для гена N количество характерных аминокислотных маркеров было ограниченным. Некоторые замены являлись общими для крупных клайдов, тогда как другие были специфичны для отдельных генетических линий, отражая дальнейшую внутриклайдовую диверсификацию. При этом выявленные групп-специфичные аминокислотные замены в белке HN не затрагивали ранее описанные функционально значимые участки, включая ключевые остатки, связанные с рецепторсвязывающей и нейраминидазной активностью. Выявленные молекулярные особенности дополнительно подтверждают филогенетическое разделение штаммов hPIV1 на устойчивые генетические группы.

Таблица 11. Характерные аминокислотные замены, специфичные для основных филогенетических клайдов и генетических линий hPIV1

(a)		
Филогенетическая группа	Ген	Характерные аминокислотные замены
Клайд А	P	F8S, P123S, P125L
	F	E5K
	L	M718I, L1605F
Клайд В	P	N56S, K270R
	HN	N355K, R385H
	L	V216S1
Клайд С	N	N498S
	P	N70D, I90V, I111V, P141S, P151S, S162F, P182S, T267I, S268G, S321G, S324P, V534A
	F	T493K, V526I, R546K
	HN	T42A, A46T, I70T, T187S, N332D, N355S, R356K, A450T, K453R, Q525K, L558F, I570V
Клайд D	L	V93I, T728A, V1506I, N1598H, K1747R, T2209I
	N	A442T, N443H, A517V
	P	S52N, K61R, P125L, R196G, S403T
	F	L7F, V25I, V155I, A214T
	HN	V22A, G31R, M66I, N355D, F466Y, K468E, K514E, G524E
(b)		
Генетическая линия С1	P	S63P, P217L, L260F, L274S, A281T, K284R, N316S, P441S, R533K
	F	S3N, K410R, G551S
	HN	K4R, E126K, Q214K, K356N
	L	L4P, G144R, K309R
Генетическая линия С2	P	R92G, P441S, S442N
	F	I6V, I506V, G513S
	HN	I60M, Q132R
	L	A2093V, I2209M
Генетическая линия D1	P	V177I
	HN	T28I, I59V, N448D, E527K
Генетическая линия D2	P	D139N, P247S, K477R
	F	: F7V, Q63R, F163L, I259T, S325F, N529S, R544K
	HN	T7P, I60T, A217T, A263T, K419E, D462N, S511N, V573D
	L	N328K, Q2223E

Обзор временного распределения российских штаммов hPIV1 представлен в Таблице 12.

Таблица 12. Временное распределение российских штаммов hPIV1 по клайдам, определённым на основе филогенетического анализа, по эпидемиологическим сезонам.

Клайд	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2020-2021	2021-2022	2022-2023	2023-2024	2024-2025	Итого*
В	1	1	7						9
С	2	1	13		4	7	4	13	44
Д						2	3		5
Итого	3	2	20		4	9	7	13	58

*Филогенетически репрезентативная подвыборка, отобранная для анализа (подробности в разделе 2.2.11)

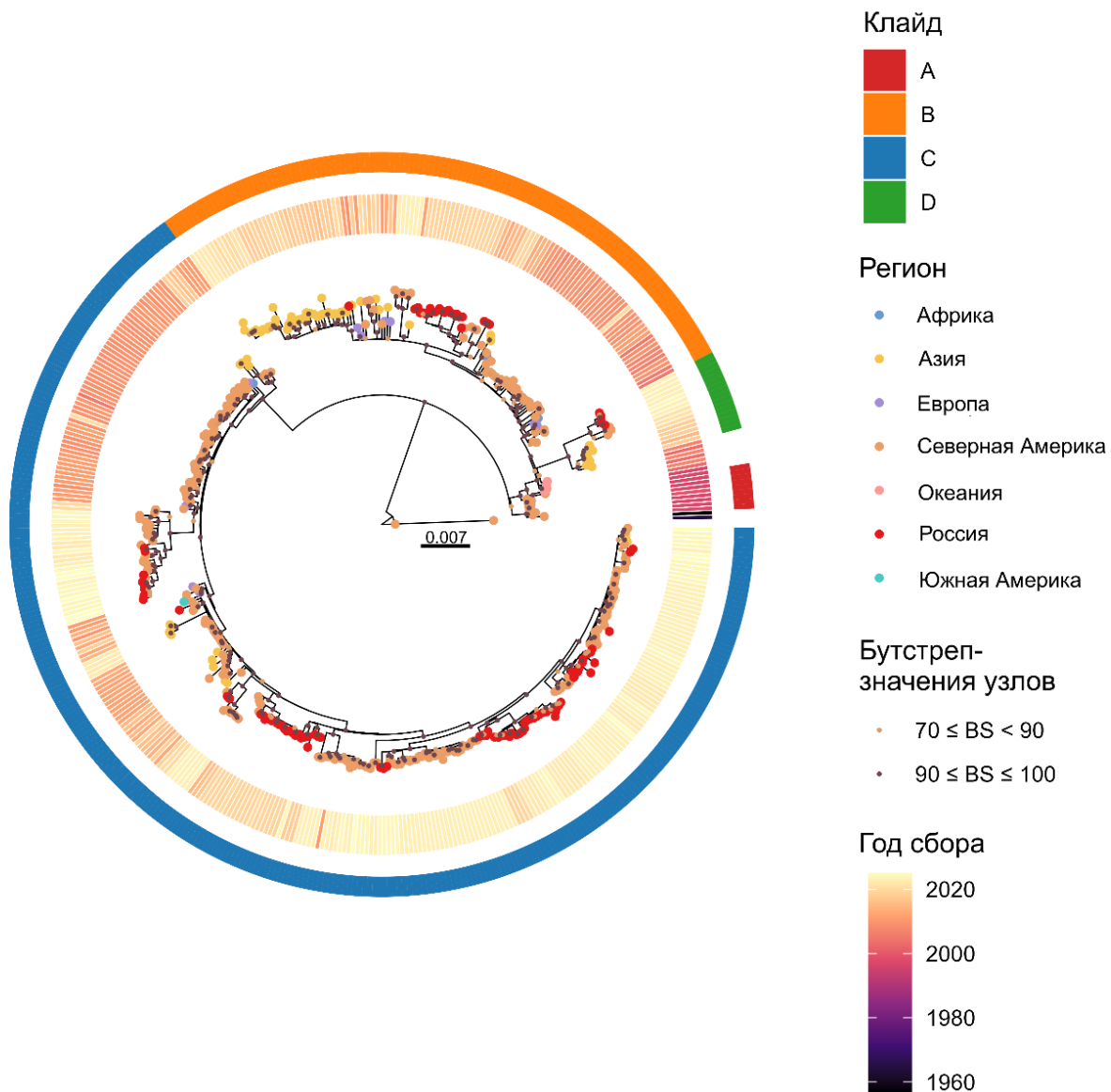


Рисунок 20. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полной геномной последовательности 457 штаммов hPIV1. Данный рисунок иллюстрирует общее генетическое разнообразие и классификацию hPIV1 в глобальном масштабе. Дерево было построено с использованием программы IQ-TREE v3.0.1. Клайды обозначены цветными полосами. Надёжность построенного дерева была подтверждена путём проведения 1000 бутстреп-репликаций; значения поддержки выше 70% указаны в узлах ветвей. Масштабная линейка отражает число нуклеотидных замен на сайт. Российские штаммы отмечены красными кружками. Подробная информация, включая принадлежность всех последовательностей к клайдам, представлена в приложении А.3 (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybNstBwLA>).

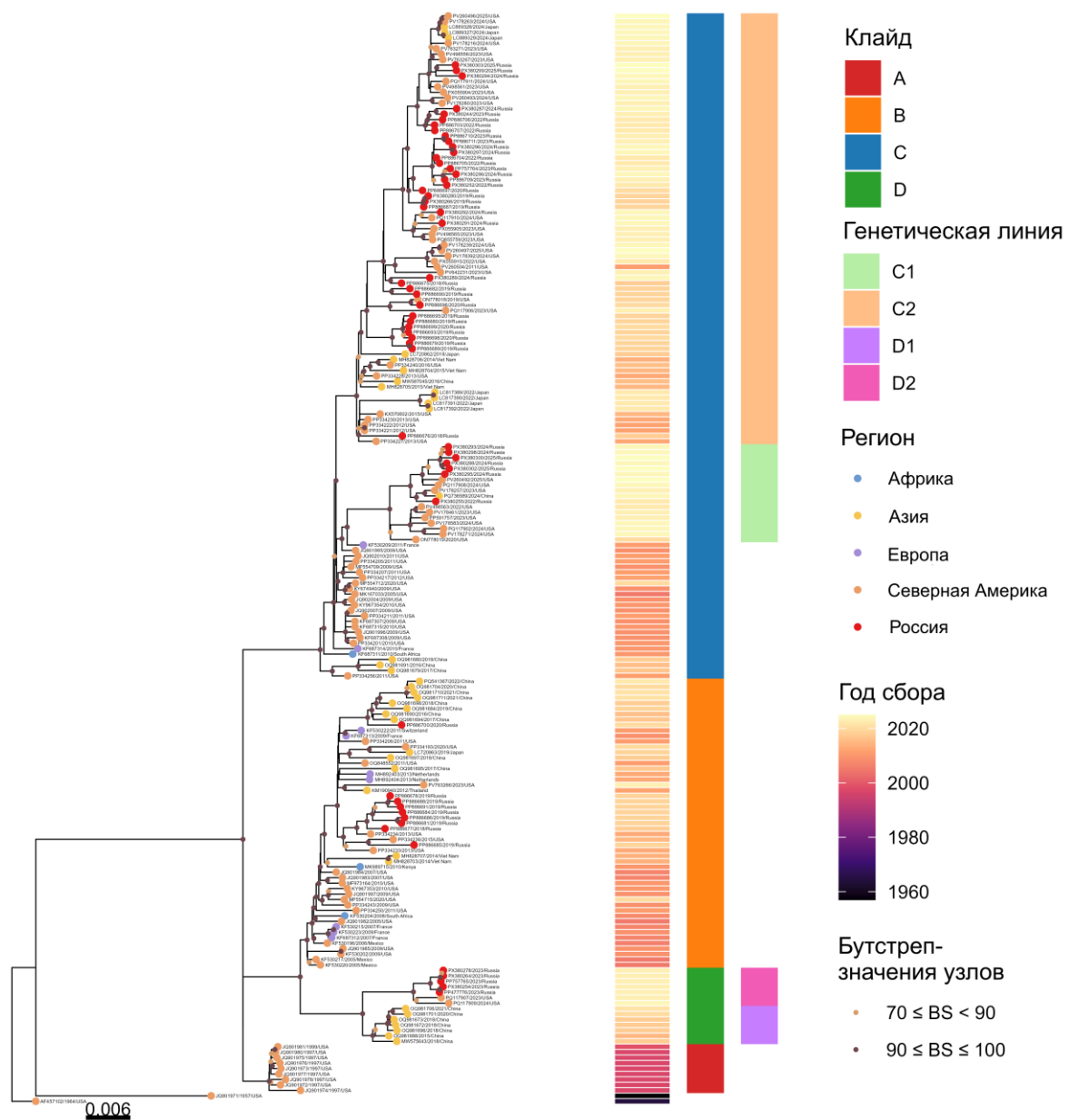


Рисунок 21. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полной геномной последовательности 200 репрезентативных штаммов hPIV1 после применения инструмента Treetmer к глобальному набору данных. Показаны клайды и генетические линии hPIV1. Обозначения соответствуют рисунку 20. Подробная информация представлена в приложении А.4; электронная версия филогенетического дерева в высоком разрешении и приложение доступны по ссылке (<https://disk.yandex.com/d/7h1imyBnStBwLA>).

3.9.2 Филогенетический анализ hPIV2

Филогенетический анализ включал 37 полногеномных последовательностей hPIV2, полученных в настоящем исследовании (Приложение В.1), а также 171 референсный геном, загруженный из базы данных NCBI GenBank, что в совокупности сформировало набор из 208 последовательностей (Рисунок 22) (Приложения В.2 и В.3).

Филогенетическое дерево, построенное на основе полных геномных последовательностей методом максимального правдоподобия, выявило два основных кластера, обозначенных А и В, разделённых средним нуклеотидным расхождением 0.0595, превышающим порог, определяющий уровень кластеров ($p \geq 0.045$), тогда как средние внутрикластерные генетические расстояния составили 0.0149 и 0.0172, соответственно (Рисунок 22). Бутстреп-анализ подтвердил устойчивость основных ветвей дерева, продемонстрировав высокую поддержку разделения кластеров А и В.

Кластер А включает шестьдесят одну последовательность и характеризуется средним внутрикластерным генетическим расстоянием $p = 0.0149$. Кластер А далее подразделяется на три подкластера (А1–А3). Подкластер А1 включает прототипный штамм GREER (GenBank accession No. AF533012), референсный штамм Toshiba (GenBank accession No. NC003443), а также штамм Japan/1190 (GenBank accession No. AB176531) и несколько штаммов из США, включая hPIV2/USA/4D10/2009, hPIV2/USA/6R8/2010, hPIV2/USA/11O9/2014 и hPIV2/USA/13F6/2016 (GenBank accession No. PP334188, OQ848525, PP068619 и PP334190 соответственно). Подкластер А2 представлен тремя российскими штаммами hPIV2/Russia/SPE-RII-2009S/2022 (PP886718), hPIV2/Russia/SPE-RII-20781S/2023 (PP886721) и hPIV2/Russia/SPE-RII-4303S/2025 (PX378079), а также тремя штаммами из Китая, выделенными в 2017 и 2024 гг. Подкластер А3 представляет более генетически разнообразную группу, включающую штаммы из нескольких стран. Только один российский штамм, hPIV2/Russia/SPE-RII-749S/2024 (PX378073), был отнесён к подкластеру А3, демонстрируя тесное филогенетическое родство со штаммом из США, выделенным в 2023 году. Попарные генетические расстояния между тремя подкластерами кластера А представлены в таблице 13.

Таблица 13. Оценки генетических расстояний между подкластерами А1–А3 кластера А

	A1	A2	A3
A1			
A2	0.0315		
A3	0.0322	0.0222	

Кластер В включает сто сорок семь последовательностей, представляя наиболее многочисленный и генетически разнообразный кластер в наборе данных hPIV2. Данный кластер подразделяется на два подкластера (В1 и В2) со средним нуклеотидным расхождением 0.0317 между ними, тогда как средние генетические расстояния внутри подкластеров составили 0.011 и 0.013, соответственно. Подкластер В1 включает всего три штамма; два из США и один из Китая, представляя относительно небольшую и генетически обособленную группу. Подкластер В2 включает большинство последовательностей кластера В и далее подразделяется на две генетические линии, обозначенные В2а и В2б, со средним генетическим расстоянием 0.0149 между ними. Средние внутригрупповые генетические расстояния в пределах линий В2а и В2б составили 0.0064 и 0.0058, соответственно. Большинство российских штаммов, выявленных в настоящем исследовании, были отнесены к линии В2а, где двадцать шесть российских вирусов сформировали кластер вместе со штаммами из США, Китая, Хорватии и Нидерландов. Оставшиеся семь российских штаммов были отнесены к линии В2б, вместе с вирусами, выявленными в США, Китае, Японии, Аргентине и Хорватии в течение последних двенадцати лет. Наиболее новые штаммы демонстрировали особенно тесные генетические связи с российскими изолятами, полученными в течение последних трёх лет, что указывает на недавнюю циркуляцию близкородственных вариантов.

Для основных филогенетических кластеров, подкластеров и генетических линий hPIV2 были определены характерные аминокислотные замены, присутствующие у большинства вирусов внутри соответствующих филогенетических групп (Таблица 14а,б,с). Наиболее выраженные различия между выделенными группами наблюдались в генах HN, Р и L, тогда как для генов М и F число характерных аминокислотных маркеров было менее значительным. Кластеры А и В различались по набору консервативных аминокислотных замен в нескольких структурных и неструктурных белках, что дополнительно подтверждает их филогенетическое разделение. Внутри основных кластеров также выявлялись специфические аминокислотные маркеры, характерные для

отдельных подкластеров и генетических линий, отражая продолжающуюся генетическую диверсификацию циркулирующих вариантов hPIV2. Анализ локализации выявленных замен показал, что они не затрагивали основные функционально значимые участки белка HN, включая остатки, вовлечённые в рецепторсвязывающую и нейраминидазную активность. Полученные данные демонстрируют согласованность между топологией филогенетического дерева и распределением групп-специфичных аминокислотных замен.

Таблица 14. Характерные аминокислотные замены, специфичные для основных филогенетических кластеров, подкластеров и генетических линий hPIV2

(a)		
Филогенетическая группа	Ген	Характерные аминокислотные замены
Кластер А	N	V46A, I156M, P474L, P488S, A524T, T528A
	P	T77A, I82V, I86T, H108Q, N120T, V300A, R335K, I349T
	F	D22G, R163K
	HN	D54N, I67V, N164H, I175S, K332T, Q345R, S351G, V367I, H376Q
	L	E924G, N1025H, V1263I
Кластер В	N	D22E, I425T, G452S, T478I, D480E, P487L, I489V
	P	S52N, A212V
	F	: I32V, T102P, Q104R, V112I, D160T, F538V
	HN	D57E, T114A, K139E, T195A, A201S, A211G, P319T, E344K, A348I, R379E, T480M, Q482R, P571L
	L	S230N, T254A, V291I, A313T, R485K, Q542R, T647I, I1951V, L2089S, K2241R
(b)		
Подкластер А2	N	L485P
	P	I93T
	F	N247K, K289R
	HN	I17S, K139N, E254D, P319S, N322K, A348T, N381S
	L	I329V, T2181I, I2245M
Подкластер А3	N	P487L, S519P
	P	A63T, V149I
	F	S64N
	HN	N360Y
Подкластер В1	N	A429V
	F	V158L, I165T, A166V
	HN	E254D, S281F, A512T
Подкластер В2	N	V26I, K32R, T442N
	P	P203L
	HN	D54N, A378E, D402G, I570M
	L	R643K, A722T
(c)		
Генетическая линия В2а	HN	E254D
	L	I329V, L2239P
Генетическая линия В2b	HN	D476N
	L	V1881I

Обзор временного распределения российских штаммов hPIV2 представлен в таблице 15.

Таблица 15. Временное распределение российских штаммов hPIV2 по кластерам и подкластерам, определённым на основе филогенетического анализа, по эпидемиологическим сезонам.

Кластер/ Подкластер	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2020-2021	2021-2022	2022-2023	2023-2024	2024-2025	Итого
A2						2		1	3
A3								1	1
B2a	6	3	4	2		9	2		26
B2b								7	7
Итого	6	3	4	2		11	2	9	37

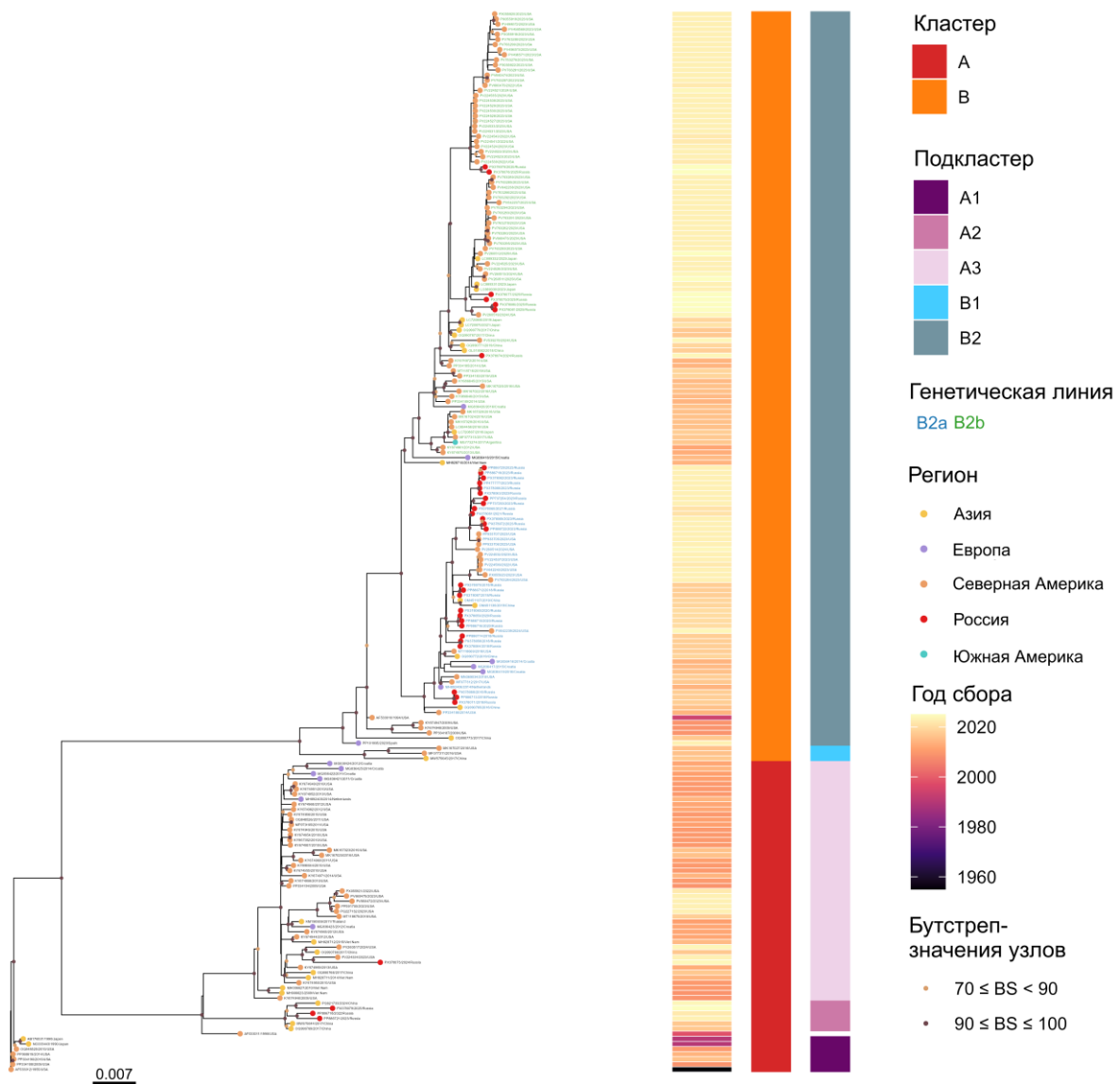


Рисунок 22. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных геномных последовательностей 208 штаммов hPIV2. Данный рисунок иллюстрирует общее генетическое разнообразие hPIV2 в глобальном масштабе. Кластеры, подкластеры и генетические линии обозначены вертикальными линиями. Значения бутстреп-поддержки выше 70 % указаны в узлах ветвей (1000 бутстреп-репликаций). Масштабная линейка отражает число нуклеотидных замен на сайт. Российские штаммы обозначены красными кружками. Подробная информация представлена в приложении В.3; электронная версия филогенетического дерева в высоком разрешении и приложение доступны по ссылке (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybNstBwLA>).

3.9.3 Филогенетический анализ hPIV3

Филогенетический анализ включал 303 полногеномные последовательности hPIV3, полученные в настоящем исследовании (Приложение С.1), а также 1036 референсных геномов, загруженных из базы данных NCBI GenBank, что в совокупности сформировало набор из 1339 последовательностей (Рисунок 23) (Приложения С.2 и С.3). В связи с большим объёмом набора данных был применён инструмент Treemmer для формирования курируемой подвыборки из 200 репрезентативных геномов, сохраняющих филогенетическое разнообразие и глобальное географическое представительство полного набора данных, что позволило обеспечить более наглядную визуализацию дерева и аннотирование аминокислотных замен (Приложение С.4).

Филогенетическое дерево на основе полных геномных последовательностей, выявило четыре основных генетических кластера (Рисунок 24). Если кластеры А, В и С ранее уже были описаны [16,30], то в ходе настоящего анализа впервые был выявлен новый четвёртый кластер, обозначенный как кластер D. Среднее нуклеотидное расхождение между кластерами превышало порог, определяющий уровень кластеров ($p \geq 0.045$), и составляло не менее 4.5%, что подтверждает отдельное эволюционное положение нового кластера D (Таблица 16). Бутстреп-анализ (1000 репликаций) продемонстрировал высокую статистическую поддержку основных кластеров; при этом новый кластер D формировал хорошо поддерживаемую монофилетическую группу со значениями бутстреп-поддержки более 90%.

Таблица 16. Оценки генетических расстояний между четырьмя кластерами.

	A	B	C	D
A				
B	0.0465			
C	0.0498	0.0561		
D	0.0534	0.0595	0.0574	

К кластеру А относится прототипный штамм C243 (ATCC VR-93) (GenBank accession No. LC817393) и представляет наиболее раннюю эволюционную линию hPIV3.

Кластер В включает штаммы, выявленные в США, Канаде, Австралии, Японии, Испании, Перу и Южной Африке, циркулировавшие преимущественно в период 1982 - середина 2010-х годов; внутрикластерное нуклеотидное разнообразие в данной группе в среднем составляло 0.027.

Кластер С является наиболее многочисленной и генетически разнообразной группой, включающей большинство штаммов, циркулирующих в мире в XXI веке. Этот кластер

подразделяется на четыре подкластера: C1, C2, C3 и C5. Обозначение C4 не было включено в анализ на основе полного генома, поскольку ранее оно было описано только на основе кодирующей последовательности гена HN, для которой полные геномные последовательности отсутствуют. Однако номенклатура была сохранена для обеспечения согласованности с ранее опубликованными исследованиями. Попарные генетические расстояния между четырьмя подкластерами кластера C представлены в таблице 17ю

Таблица 17. Оценки генетических расстояний между четырьмя подкластерами кластера C.

	C1	C2	C3	C5
C1				
C2	0.0333			
C3	0.0362	0.0282		
C5	0.0379	0.0294	0.0290	

Большинство исследованных нами российских штаммов, были отнесены к кластеру C, где они распределились между четырьмя подкластерами. В пределах подкластера C1 штаммы демонстрировали умеренное генетическое разнообразие (среднее нуклеотидное расхождение 0.0141); данный подкластер подразделяется на три генетические линии (C1a–C1c). Линия C1a включает пять штаммов из Аргентины, Мексики, Бразилии и Перу. Линию C1b образуют штаммы из Австралии, США, Франции, Великобритании, Вьетнама, Замбии, Южной Африки и Перу, выявленные в период 2007–2011 гг. Единственный российский штамм hPIV3/Russia/SPE-RII-90S/2019 (PX360776) сгруппировался в пределах линии C1c с тремя штаммами из США. Подкластер C2 оказался наиболее генетически однородным среди подкластеров кластера C: среднее внутригрупповое нуклеотидное расхождение составило всего 0.0059. В него вошёл один российский штамм hPIV3/Russia/SPE-RII-17085S/2022 (PX360805) вместе с пятью штаммами из США, выделенными в 2010 году. Подкластер C5 объединил семнадцать российских штаммов со штаммами из Мексики, Франции, США, Аргентины, Японии, Южной Африки, Швейцарии и Великобритании; уровень внутреннего генетического разнообразия в этой группе был 0.0130. Среди подкластеров кластера C наибольшим внутренним разнообразием отличался подкластер C3 (среднее нуклеотидное расхождение 0.0167), включающий пять генетических линий: C3a, C3b, C3c, C3e и C3f. Три российских штамма hPIV3/Russia/SPE-RII-3243S/2018 (PX360741), hPIV3/Russia/SPE-RII-2616S/2018 (PX360739) и hPIV3/Russia/SPE-RII-889S/2020 (PX360784) объединились в линию C3b со штаммами из Китая, Вьетнама, Таиланда, Японии, Франции, США,

Аргентины, Бразилии, Южной Африки и Перу. Линия С3е представлена тремя российскими штаммами hPIV3/Russia/SPE-RII-73S/2019 (PX360774), hPIV3/Russia/SPE-RII-27578S/2022 (PX360866) и hPIV3/Russia/SPE-RII-11729S/2024 (PX360972), близкородственными последовательностям из Франции, США, Швейцарии, Нидерландов и Перу. Наибольшее число российских штаммов группируется в пределах линии С3а совместно с многочисленными штаммами из различных регионов мира. Попарные генетические расстояния между пятью генетическими линиями подкластера С3 представлены в таблице 18.

Таблица 18. Оценки генетических расстояний между генетическими линиями подкластера С3.

	С3а	С3б	С3с	С3е	С3f
С3а					
С3б	0.0178				
С3с	0.0183	0.0149			
С3е	0.0124	0.0180	0.0134		
С3f	0.0169	0.0133	0.0131	0.0144	

Помимо ранее описанных кластеров, семь российских штаммов hPIV3/Russia/SPE-RII-4934S/2025, hPIV3/Russia/SPE-RII-22556S/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-4682S/2025, hPIV3/Russia/SPE-RII-19614S/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-22250S/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-11534S/2024 и hPIV3/Russia/SPE-RII-17999S/2023 сформировали отдельную генетическую группу, обозначенную как кластер D. В состав этого нового кластера входят также недавно выявленные штаммы из Франции, Германии, Пакистана, Сингапура и Малайзии и четыре штамма из США, что свидетельствует о недавней глобальной циркуляции ранее неописанной генетической группы. Таким образом, полученные результаты демонстрируют продолжающуюся диверсификацию hPIV3 и выявляют формирование ранее неописанного генетического кластера (кластер D), циркулирующего в различных географических регионах.

Анализ аминокислотных последовательностей выявил характерные паттерны аминокислотных замен для кластеров, подкластеров и генетических линий hPIV3 (Таблица 19a,b,c). Наиболее выраженные различия между выделенными филогенетическими группами наблюдались в генах Р, НН и L, тогда как для генов N, М и F число групп-специфичных аминокислотных замен было менее значительным. Кластеры В и С характеризовались относительно ограниченным числом консервативных замен, тогда как для кластера D был выявлен значительно более широкий спектр групп-специфичных аминокислотных маркеров,

распределённых практически по всем структурным белкам вируса. Наиболее выраженные молекулярные особенности кластера D наблюдались в генах P, HN, F и L, что дополнительно подтверждает его генетическую обособленность по сравнению с ранее описанными кластерами hPIV3. Несмотря на наличие характерных аминокислотных маркеров, включая замены в белке HN, выявленные вариации не затрагивали ранее описанные функционально значимые участки данного гликопротеина. Внутри кластера C также были выявлены специфические аминокислотные маркеры, характерные для отдельных подкластеров и генетических линий, отражая продолжающуюся внутрикластерную диверсификацию современных вариантов hPIV3.

Таблица 19. Характерные аминокислотные замены, специфичные для основных филогенетических кластеров, подкластеров и генетических линий hPIV3

(a)		
Филогенетическая группа	Ген	Характерные аминокислотные замены
Кластер B	N	G489S
	P	M224T, S259P, P324S, I423T
	M	S143N
	HN	T33I, V76I, A348V, K524R
	L	H102Y, V193I, M197V, N1750D, G1759S
Кластер C	P	S113G, D143N, K220R, S293P, I304T, T322A
	F	N441D, I496V, I501M
	HN	I40T, M82V
	L	N81S, S1275N, K1413R, T1711S, R1753G, A1756V, V2194I
Кластер D	N	N452T, N510S
	P	S3N, L44I, E73Q, T79I, T92A, V122M, D145N, D155N, S156T, P168S, F178P, V206I, I258T, T279I, N280Y, G285E, I289V, Q297K, S298F, L303P, A312V, T317A, S326A, N328T
	M	N46D, I68T, V127I, P199S, V278I, S285T, V293A
	F	N102H, G113A, K146N, E149K, R152K, I165V, A188E, T444I, F505S, I506M, T513I
	HN	A13V, E18G, L28F, V42M, S58N, N70S, M74I, E75G, S84T, E514K, K524R
	L	K96N, N156S, F210V, E271D, R327K, S335N, E385R, G702E, I720M, N1359T, A1498G, G1759S, V1826I, I1966M, V2126I, E2218D
(b)		
Подкластер C1	N	K468N
	P	R111G, S114G, S124P, D175N, V206I, I289T, S316N, S568P
	F	A188T
	HN	K27R, K168R
	L	S634A, N1750S, N1866S
Подкластер C2	N	R398K
	P	I149T, I157T, F178S, I289T, P293S, P299L
	F	C18S, N538T
	HN	H24N, K60Q
Подкластер C5	L	V51A, P924Q, S1757N
	N	T494A
	P	E73K, T121A, S229V, S298P, P299L, V528L
	F	R87K, I165V, V496I

	HN	F73L
	L	T163A, N1713S, D1752N, N2223H
Подкластер С3	P	I258T
	HN	I53T
	L	R2179K
(с)		
Генетическая линия С1b	N	G489S
	P	T304I
	F	V527M
Генетическая линия С1с	N	L169I, N452S
	P	I157T, T278A, T318A
	F	L7S, I9V, T10A, M14V, A188E, T492A
	HN	A13T, P138L, V191I
	L	N227D, A634T, V1937I
Генетическая линия С3а	N	E404D
Генетическая линия С3b	F	L7S
	HN	A13V
Генетическая линия С3с	N	T142N
	P	G176S, T254A, S294P, S339P
	F	L7S, V32I, A188E
	HN	L28F
	L	K917R, L1733F
Генетическая линия С3е	N	Q440R
	L	I133V
Генетическая линия С3f	L	N1275S

Обзор временного распределения российских штаммов hPIV3 представлен в таблице 20.

Таблица 20. Временное распределение российских штаммов hPIV3 по кластерам и подкластерам, определённым на основе филогенетического анализа, по эпидемиологическим сезонам.

Кластер/ Подкластер	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2020-2021	2021-2022	2022-2023	2023-2024	2024-2025	Итого*
C1			1						1
C2					1				1
C5	5	2	1		2	4	1	2	17
C3b	2		1						3
C3е			1		1		1		3
C3а	2	2	2	3	4	8	2	4	27
D						4	1	2	7
Итого	9	4	6	3	8	16	5	8	59

*Филогенетически репрезентативная подвыборка, отобранная для анализа (подробности в разделе 2.2.11)

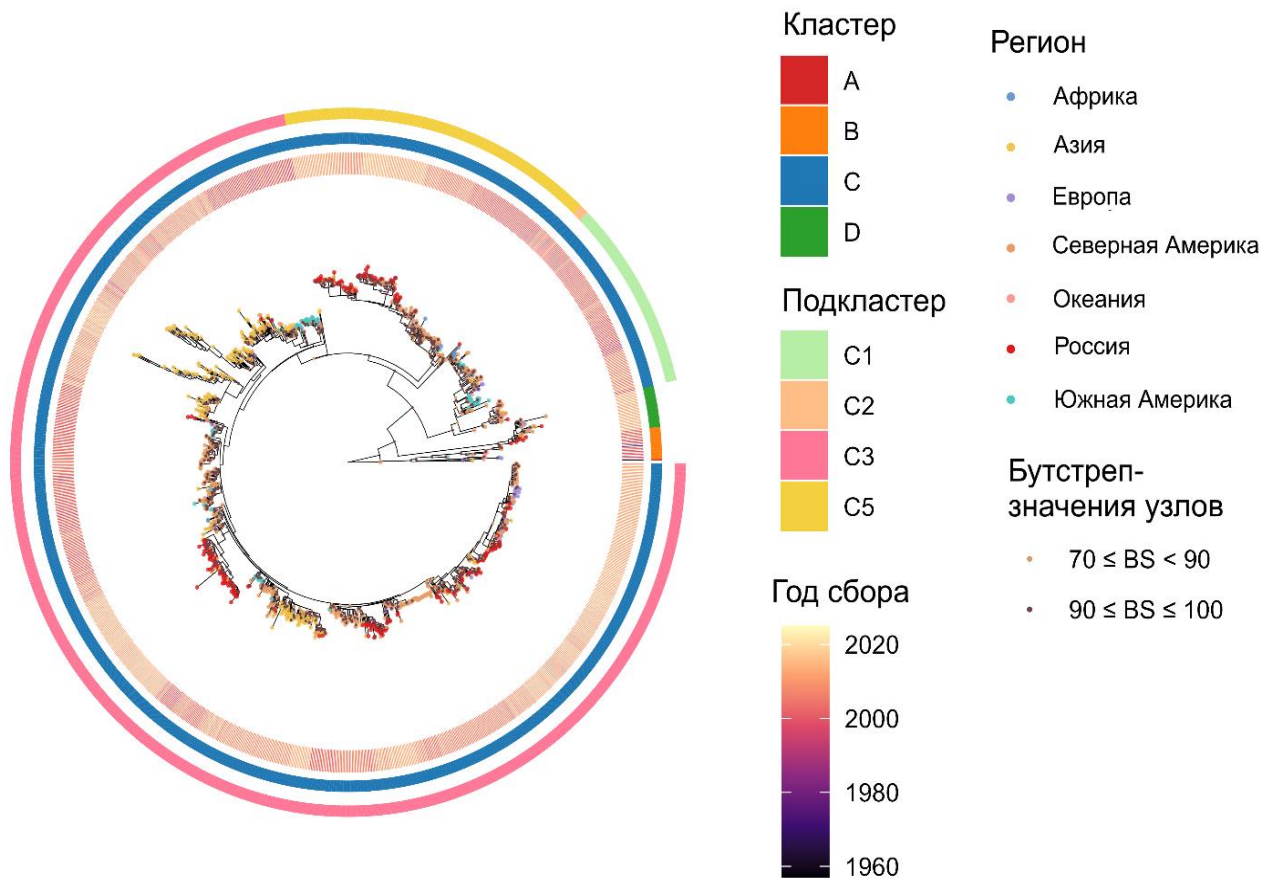


Рисунок 23. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных геномных последовательностей 1339 штаммов hPIV3. Данный рисунок иллюстрирует общее генетическое разнообразие hPIV3 в глобальном масштабе. Кластеры и подкластеры обозначены цветными полосами. Значения бутстреп-поддержки выше 70 % указаны в узлах ветвей (1000 бутстреп-репликаций). Масштабная линейка отражает число нуклеотидных замен на сайт. Российские штаммы обозначены красными кружками. Подробная информация представлена в приложении С.3 (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybNstBwLA>).

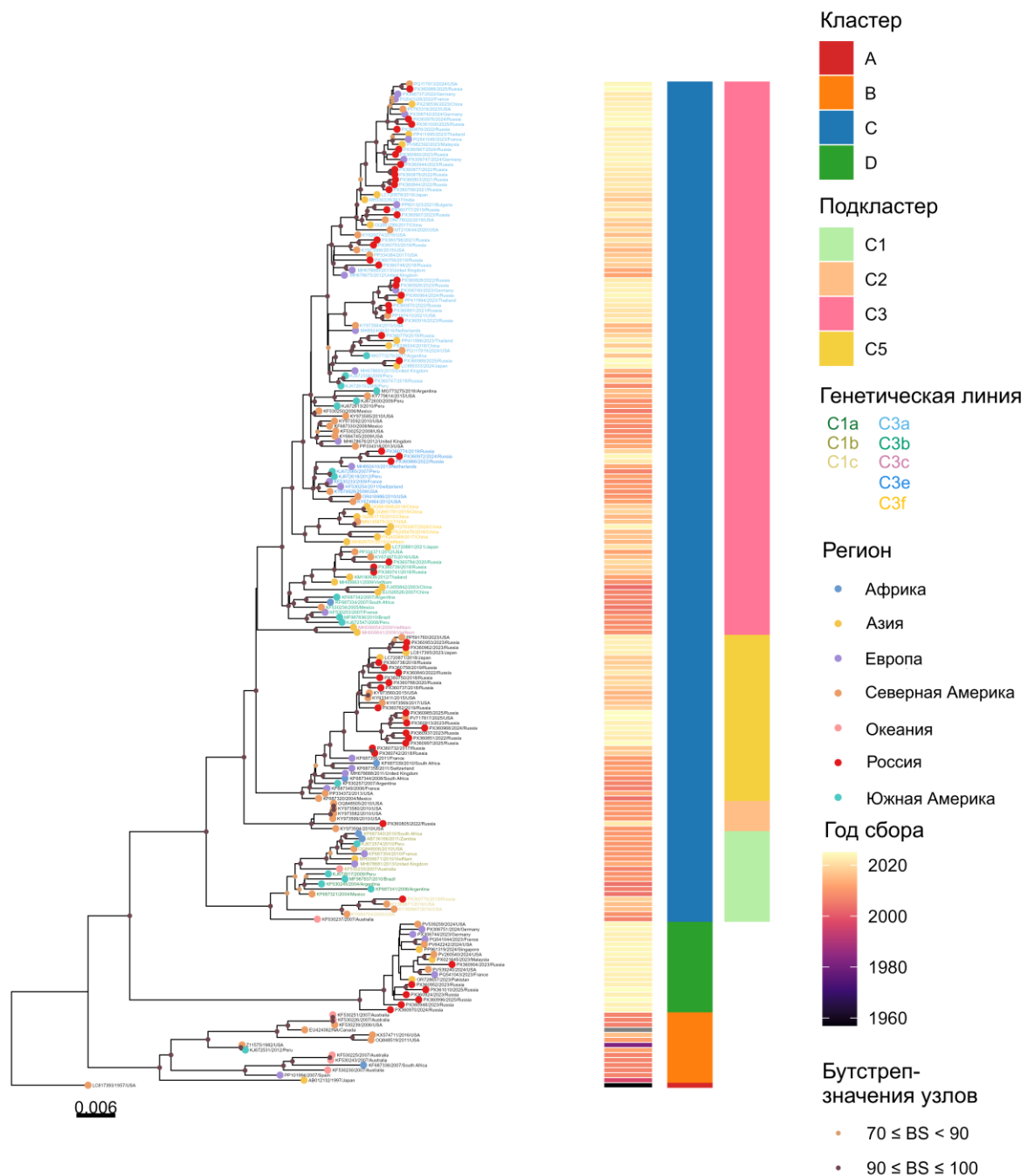


Рисунок 24. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных геномных последовательностей 200 репрезентативных штаммов hPIV3 после применения инструмента TreeKmer к глобальному набору данных. Показаны кластеры, подкластеры и генетические линии hPIV3. Обозначения соответствуют рисунку 23. Подробная информация представлена в приложении С.4; электронная версия филогенетического дерева в высоком разрешении и приложение доступны по ссылке (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybnstBwLA>).

3.9.4 Филогенетический анализ hPIV4

Филогенетический анализ включал 8 полногеномных последовательностей hPIV4, полученных в настоящем исследовании (Приложение D.1), а также 167 штаммов, загруженных из базы данных NCBI GenBank, что в совокупности сформировало набор из 175 последовательностей (Рисунок 25) (Приложение D.2 и D.3).

Максимально-правдоподобное филогенетическое дерево, построенное на основе полных геномных последовательностей, позволило выделить два чётко разделённых подтипа — hPIV4a и hPIV4b (Рисунок 25). Определение подтипов на основе попарных генетических расстояний по полному геному относительно прототипных штаммов hPIV4a M-25 (GenBank accession No. AB543336) и hPIV4b 68-333 (GenBank accession No. AB543337) позволило идентифицировать 129 геномов hPIV4a и 46 геномов hPIV4b. Среднее нуклеотидное расхождение между двумя подтипами составило 0.151, тогда как средняя внутривидовая вариабельность составила 0.0149 и 0.0319 для hPIV4a и hPIV4b соответственно.

Внутри hPIV4a на основе топологии дерева и значений p -distance были выделены три основных кластера А, В и С, при этом среднее нуклеотидное расхождение между кластерами превышало порог, определяющий уровень кластеров ($p \geq 0.045$) (Таблица 21).

Таблица 21. Оценки генетических расстояний между тремя кластерами hPIV4a.

	А	В	С
А			
В	0.0522		
С	0.0652	0.0464	

Кластер А включает прототипный штамм М-25, выделенный в Японии в 1966 году (GenBank accession No. AB543336). Кластер В включает два штамма из Дании (HPIV4_DK(459), GenBank accession No. KF483663) и Австралии (HPIV-4a_QPID08-0015, GenBank accession No. KF878965). Кластер С представляет собой более генетически разнообразную группу и далее подразделяется на три подкластера: С1, С2 и С3. Подкластер С1 представлен одним аргентинским штаммом HPIV4a-HNRG (GenBank accession No. OP615960) и двумя штаммами из Нидерландов — t146a296_HPIV4 и t146a303_HPIV4 (GenBank accession No. MH892407 и MH892408), со средним внутривидовым расхождением 0.0095. Подкластер С2 включает пять штаммов из Тайваня (TW-00029-2010, GenBank accession No. KY460518), Вьетнама (vzhpiv42, GenBank

accession No. MH828709), США (HPIV4/USA/12N9/2015, GenBank accession No. PP068624), а также один штамм из Китая BCH4237A/2014 (GenBank accession No. MW575665), со средним внутриподкластерным расхождением 0.0108. Подкластер С3 является наиболее распространённой группой, включающей 119 геномов, выявленных на различных континентах, со средним внутриподкластерным расхождением 0.0109. Средние генетические расстояния между подкластерами кластера С представлены в таблице 22.

Таблица 22. Оценки генетических расстояний между подкластерами кластера С hPIV4a.

	C1	C2	C3
C1			
C2	0.0208		
C3	0.0277	0.0231	

Все восемь российских изолятов hPIV4 были отнесены к hPIV4a, кластеру С, подкластеру С3. Два изолята hPIV4/Russia/SPE-RII-1011V2/2018 и hPIV4/Russia/SPE-RII-1011V1/2018 (GenBank accession No. PX353455 и PX353459) демонстрируют близкое генетическое родство со штаммами, ранее выявленными в США, Японии и Тайване. Три изолята hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V1/2023, hPIV4/Russia/SPE-RII-2697V1/2023 и hPIV4/Russia/SPE-RII-1446V2/2023 (GenBank accession No. PX353456, PX353457 и PX353461) сгруппировались вместе со штаммами из США, Японии и Индии. Два изолята hPIV4/Russia/SPE-RII-27084V1/2021 и hPIV4/Russia/SPE-RII-21726V2/2023 (GenBank accession No. PX353458 и PX353462) формировали группу вместе со штаммами из США. Оставшийся российский изолят hPIV4/Russia/SPE-RII-1280V2/2023 (GenBank accession No. PX353460) демонстрирует близкое родство со штаммами из США и Японии. Среднее генетическое расстояние по полному геному между российскими штаммами и прототипом hPIV4a М-25 составило 0.0647, тогда как среднее расхождение между российскими штаммами составило 0.0129.

Последовательности hPIV4b разделились на два кластера А и В, генетическое расхождение между которыми превышало 4.9 %. Кластер А включает один штамм из Канады SKPIV4 (GenBank accession No. EU627591) и восемь штаммов из США, со средним внутрикластерным расстоянием 0.0103. Кластер В включает 35 штаммов из Австралии, США, Японии, Китая и Вьетнама, со средней внутрикластерной вариабельностью 0.0186. Этот кластер далее подразделяется на два подкластера — В1 и В2, со средним генетическим расстоянием между ними 0.0294.

Для hPIV4a анализ аминокислотных последовательностей выявил характерные молекулярные признаки, соответствующие выделенным филогенетическим кластерам и подкластерам (Таблица 23а,b). Кластер В характеризовался относительно ограниченным числом групп-специфичных аминокислотных замен, тогда как для кластера С был выявлен более широкий спектр консервативных замен, затрагивающих гены N, P, HN и L. Наиболее выраженные различия внутри hPIV4a наблюдались в генах HN и L, где определялись как кластер-специфичные, так и подкластер-специфичные аминокислотные маркеры. Дополнительные молекулярные особенности были характерны для подкластеров С1–С3, отражая дальнейшую генетическую диверсификацию современных вариантов hPIV4a. При этом характерные аминокислотные замены, выявленные в белке HN, преимущественно располагались вне ранее описанных функционально значимых областей данного белка.

Таблица 23. Характерные аминокислотные замены, специфичные для основных филогенетических кластеров и подкластеров hPIV4a

(a)		
Филогенетическая группа	Ген	Характерные аминокислотные замены
Кластер В	P	A272S
	F	K514N
	HN	K62R
Кластер С	N	N431S, T513P, I526T
	P	L36I, G51D, A66D, H67R
	M	M326I
	F	T503I, H533Q
	HN	T44I, K381R, I478T
	L	V74I, L506I, R639I, K1140R, V1571I, N1779K, T2025A, A2168S, T2250I
(b)		
Подкластер С1	N	S462P
	HN	V45I, N149K, G333E
Подкластер С2	HN	N58K, T59H
	L	K1779N
Подкластер С3	N	T498S
	P	D51G, N145D
	HN	V125M
	L	K645R, Y647C

Для hPIV4b были выявлены отчётливые различия в распределении характерных аминокислотных замен между основными филогенетическими кластерами и подкластерами (Таблица 24а,b). Кластер А характеризовался сравнительно небольшим числом консервативных аминокислотных маркеров, тогда как для кластера В определялся значительно более широкий спектр групп-специфичных замен, распределённых по большинству структурных и неструктурных

белков вируса. Наиболее выраженная диверсификация наблюдалась в генах Р, HN, F и L, где выявлялось наибольшее количество характерных аминокислотных замен. Внутри кластера В также определялись дополнительные молекулярные особенности, характерные для подкластеров В1 и В2, что отражает продолжающуюся внутрикластерную эволюцию hPIV4b. Анализ распределения замен в белке HN показал, что выявленные групп-специфичные вариации не затрагивали известные функционально значимые участки данного гликопротеина.

Таблица 24. Характерные аминокислотные замены, специфичные для основных филогенетических кластеров и подкластеров hPIV4b

(a)		
Филогенетическая группа	Ген	Характерные аминокислотные замены
Кластер А	N	Q468P
	M	Q317H
	F	D150N, R153Q, A194G
	HN	V29I, F337Y
	L	K2006R, V2220I
Кластер В	N	D151E, N519D, H530R, D532N
	P	V7M, N32S, P39S, I43T, N49T, N51D, I55T, P81S, M100T, S182N, F185S, N213S, L227S, A304V, I340T
	M	H117N, S379G
	F	A77V, R90H, K157E, N185D, V193A, V500L, K517R
	HN	N12S, I100T, R151Q, A198E, N204K, N219D, G233R, R348K, K354T, Y396H, P434S
L	S171N, H229Y, L658F, H1200Q, K1738N, V1752I, I1906T, V2212I	
(b)		
Подкластер В1	N	P495S, N532S
	P	S56P, A157V, S174P
	F	I279V, T446A
	HN	M68K, R367G, I444T, P569S
	L	H331R, T424M, R1777Q, I1807V
Подкластер В2	N	P512S
	P	L34P, K57R, A68T, H75Y, G300E
	F	K64N, T140K, D182N, N401T
	HN	V133A, I444V
	L	G659E, A1389S, K2006R, D2065N, V2254I

Обзор временного распределения российских изолятов hPIV4a представлен в таблице 25.

Таблица 25. Временное распределение российских изолятов hPIV4a по кластерам и подкластерам, определённым на основе филогенетического анализа, по эпидемиологическим сезонам.

Кластер/ Подкластер	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2020-2021	2021-2022	2022-2023	2023-2024	2024-2025	Итого
С3	2			1		1	4		8

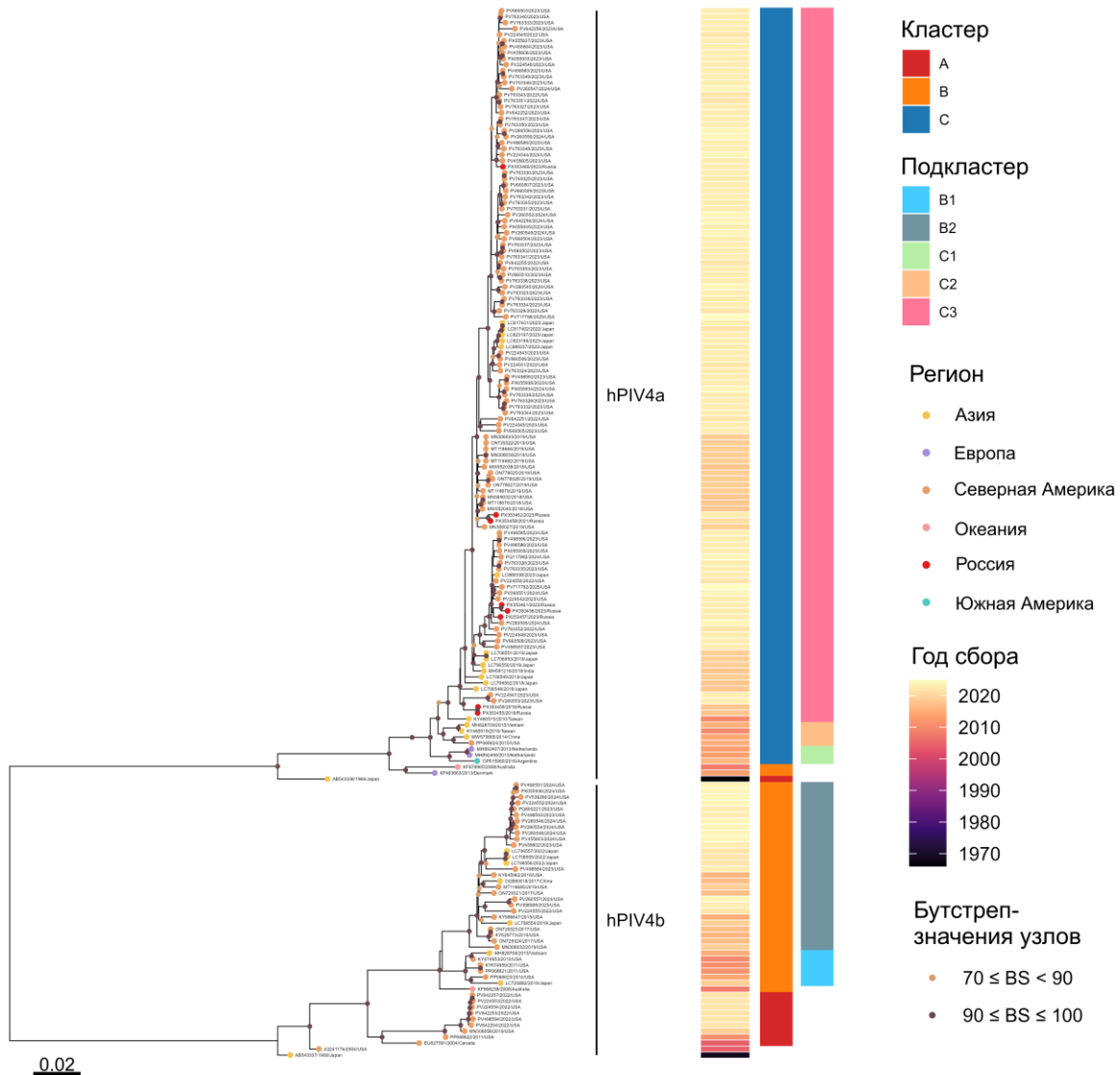


Рисунок 25. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полных геномных последовательностей 175 штаммов hPIV4. Показаны подтипы hPIV4a и hPIV4b, а также соответствующие кластеры и подкластеры. Значения бутстреп-поддержки выше 70 % указаны в узлах ветвей (1000 бутстреп-репликаций). Масштабная линейка отражает число нуклеотидных замен на сайт. Восемь российских изолятов обозначены красными кружками. Подробная информация представлена в приложении D.3; электронная версия филогенетического дерева в высоком разрешении и приложение доступны по ссылке (<https://disk.yandex.com/d/7h1imybNstBwLA>).

3.10 Филогенетический анализ на основе гена HN и анализ аминокислотных замен

Для дальнейшего исследования генетической изменчивости и выявления молекулярных маркеров, связанных с диверсификацией вирусов парагриппа человека, был проведен дополнительный филогенетический анализ на основе полной кодирующей последовательности гена HN. Филогенетические деревья, реконструированные для всех четырех типов hPIV, были сопоставлены с кластерными паттернами, полученными в результате полногеномного анализа, для оценки согласованности выявленных кластеров, подкластеров и генетических линий. Используя структуру TreeSub вместе с реконструкцией предковых состояний (ASR), реализованной с помощью PAML, были определены аминокислотные замены, происходящие вдоль отдельных ветвей филогенетических деревьев. Этот подход позволил идентифицировать аминокислотные изменения в белке HN, связанные со специфическими кластерами, подкластерами и генетическими линиями, предоставляя потенциальные молекулярные маркеры генетической диверсификации вируса.

3.10.1 Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV1

Филогенетический анализ, основанный на полной последовательности гена HN, обеспечил дополнительное разрешение генетических взаимосвязей между штаммами hPIV1 и в значительной степени совпал с топологией, выведенной из полногеномных последовательностей (Рисунок 26). Дерево, построенное на основе последовательности гена HN, воспроизвело основные клайды А, В, С и D и генетические линии (C1, C2, D1 и D2), идентифицированные при анализе полного генома, что подтверждает стабильность предложенной классификации при использовании разных геномных регионах. Бутстреп-анализ (1000 повторов) показал высокую статистическую поддержку основных ветвей дерева: большинство узлов, определяющих клайды, имели значения поддержки выше 70%. Иерархическая структура клайдов сохранялась и в филогенетическом дереве, построенном по гену HN. Эти результаты свидетельствуют о том, что ген HN содержит достаточный филогенетический сигнал для надежного разделения основных генетических групп hPIV1 и воспроизводит классификацию, полученную при анализе полного генома.

Незначительное топологическое различие наблюдалось для клайда А, который включает девять штаммов из США, выделенных в конце 1990-х годов. На дереве, построенном на основе HN, этот клайд занимал промежуточное положение, располагаясь между клайдами В и С, а не в

базальной позиции, наблюдаемой в полногеномной филогении. Такая перестройка, скорее всего, отражает различия в филогенетическом сигнале между геном HN и полным геномом, поскольку вариации, специфичные для гена, могут незначительно изменять порядок ветвления, не влияя на общую структуру клайдов. Подобные незначительные топологические различия между филогенетическими деревьями, построенными на основе отдельных генов и полных геномов, нередко наблюдаются у РНК-вирусов и обычно не приводят к изменению общей структуры выделяемых филогенетических групп. Важно отметить, что генетический состав и целостность клайда А остались неизменными, и штаммы, принадлежащие к этой группе, по-прежнему образовывали единую монофилетическую ветвь.

Для более детальной характеристики молекулярных особенностей, связанных с наблюдаемой филогенетической структурой, аминокислотные замены в белке HN были реконструированы вдоль ветвей филогенетического дерева с использованием метода реконструкции предковых состояний. Анализ распределения аминокислотных вариаций на дереве позволил выявить ряд замен, устойчиво характерных для отдельных кластеров, подкластеров и генетических линий.

Четыре основных клайда имели широкий спектр общих аминокислотных замен по сравнению с референсными штаммами Washington 1964 и ATCC VR-94, включая N8I, T45A, V46A, F49L, M76V, R131K, S151T, I335V, D349N, T358P, N443K, K448N, E453K, Q461P, Y466F, R468K, E514K и V524G, что указывает на общую молекулярную сигнатуру этой основной генетической группы. Кроме того, четыре клайда характеризовались специфическими заменами; клайды В и D имели общие замены H34Y, I245V, R356S, V489F, N511S и I573V, что подтверждает их тесную эволюционную связь. Клайд D дополнительно характеризовался заменами V22A, G31R, M66I, N355D, F466Y, K468E, K514E и G524E. Внутри этого клайда генетическая линия D1 показала дополнительные замены T28I, I59V, N448D и E527K, тогда как линия D2 определялась заменами T7P, I60T, A217T, A263T, K419E, D462N, S511N и V573D. Примечательно, что пять российских штаммов, принадлежащих к линии D2, имели три дополнительные замены (E78D, E419K и V454I), что указывает на локальную диверсификацию внутри этой линии. Клайд В был связан с заменами N355K и R385H. Клайд С, представляющий наиболее разнообразную группу среди четырех клайдов, характеризовался более широким набором замен, включая T42A, A46T, I70T, T187S, N332D, N355S, R356K, A450T, K453R, Q525K, L558F и I570V. Внутри этого клайда линия С1

определялась заменами K4R, E126K, Q214K и K356N, тогда как линия C2 имела две замены: I60M и Q132R. Дополнительные вариации аминокислот были распределены вдоль внутренних ветвей этих линий, отражая продолжающуюся диверсификацию внутри клайда C. В клайд A не удалось выявить каких-либо дополнительных аминокислот замен, помимо тех, которые были общими для всех четырех клайдов. Однако три штамма внутри этого клайда несли замену T553I, что указывает на ограниченную дополнительную диверсификацию внутри этой группы.

В целом, распределение аминокислотных замен в филогенетическом дереве гена HN соответствовало иерархической структуре, выявленной при анализе полного генома, и позволило выделить характерные молекулярные признаки основных генетических групп hPIV1.

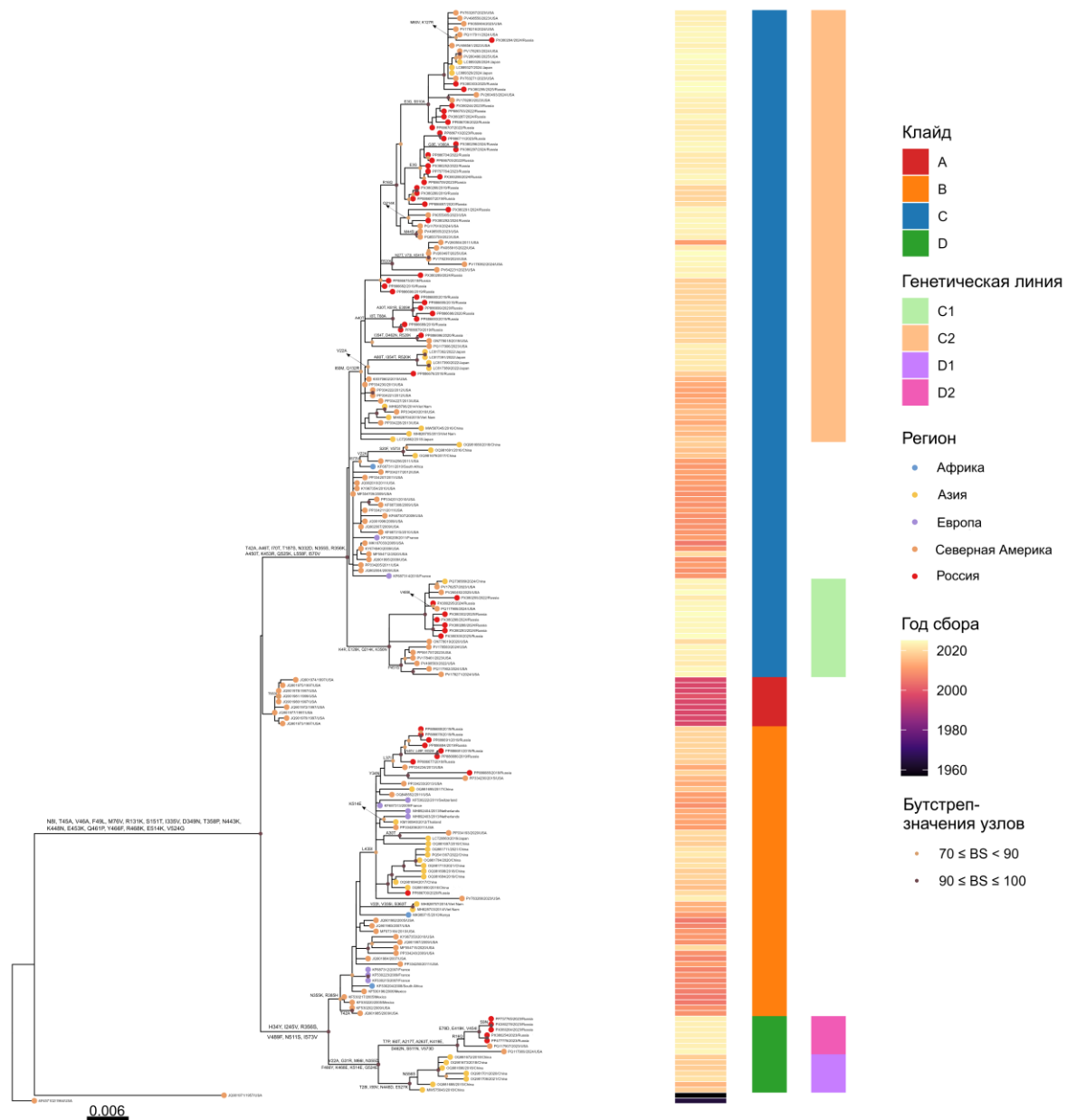


Рисунок 26. Филогенетические деревья максимального правдоподобия, построенные на основе полной последовательности гена HN 200 штаммов hPIV1. Деревья были построены с использованием инструмента TreeSub (комбинация RAxML для филогенетического анализа и PAML для реконструкции предкового состояния). Классификация на клайды и генетические линии обозначена вертикальными линиями. Точность дерева была подтверждена применением 1000 бутстреп-репликаций, а значения, превышающие 70%, обозначены только в узлах ветвей. Масштабная линейка указывает количество нуклеотидных замен на сайт. Электронная версия филогенетического дерева в высоком разрешении доступна по ссылке (<https://disk.yandex.com/d/7h1imyBnstBwLA>).

3.10.2 Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV2

Филогенетическая реконструкция, основанная на полной последовательности гена HN, позволила детально охарактеризовать генетические взаимоотношения между штаммами hPIV2 и показала высокое соответствие топологии, полученной при анализе полных геномов (Рисунок 27). Филогенетическое дерево, построенное по последовательности гена HN, воспроизводило основную иерархическую структуру, выявленную при анализе полного генома, включая два основных кластера (А и В), соответствующие им подкластеры (А1–А3 и В1–В2), а также генетические линии (В2а и В2б). Структура ветвления дерева имела высокую статистическую поддержку во внутренних узлах, что свидетельствует о том, что ген HN содержит достаточный филогенетический сигнал для разделения основных генетических групп hPIV2 и воспроизводит классификацию, полученную при анализе полного генома.

Для выявления молекулярных особенностей, лежащих в основе наблюдаемых филогенетических взаимоотношений, аминокислотные вариации белка HN были проанализированы в контексте реконструированного филогенетического дерева. С использованием метода реконструкции предковых состояний аминокислотные замены были прослежены вдоль ветвей дерева, что позволило выявить характерные паттерны вариаций, специфичные для основных кластеров, подкластеров и генетических линий.

В пределах кластера А подкластеры А2 и А3 имели общий набор аминокислотных замен, включая D54N, I67V, N164H, I175S, K332T, Q345R, S351G, V367I и N376Q, что указывает на наличие общего молекулярного профиля для данной ветви филогенетического дерева. Дополнительные замены позволяли различать отдельные генетические линии внутри этого кластера. Подкластер А2, включающая три российских штамма, характеризовалась заменами T117S, K139N, E254D, P319S, N322K, A348T и N381S. В отличие от этого, подкластер А3 преимущественно определялся заменой N360Y, которая последовательно выявлялась у представителей данной группы.

Более широкий и отличительный набор аминокислотных вариаций наблюдался в кластере В, который характеризовался заменами D57E, T114A, K139E, T195A, A201S, A211G, P319T, E344K, A348I, R379E, T480M, Q482R и P571L по сравнению с кластером А. Внутри этого кластера дополнительные замены были связаны с формированием двух нисходящих подкластеров.

Подкластер В1 характеризовался заменами E254D, S281F и A512T, что отличало его от остальных штаммов кластера В.

Подкластер В2, представляющий наиболее многочисленную и генетически разнообразную ветвь внутри кластера В, определялся заменами D54N, A378E, D402G и I570M. За исключением одного испанского штамма (MBC038), принадлежащего к подкластеру В2, все остальные штаммы этого подкластера имели общую замену N164H, что указывает на наличие консервативной молекулярной особенности для большинства вирусов группы В2. Дополнительная вариабельность наблюдалась на уровне генетических линий внутри подкластера В2. Линии В2а и В2b характеризовались также заменами E57D и V137A, что отражает постепенную диверсификацию внутри данной ветви филогенетического дерева. Замена E254D являлась характерным признаком линии В2а, при этом все 27 российских штаммов, отнесённых к данной линии, содержали эту замену. Аналогично, замена D476N была характерна для линии В2b и выявлялась у всех штаммов, входивших в состав данной линии. Дополнительные аминокислотные вариации наблюдались на внутренних ветвях линий В2b, что свидетельствует о продолжающейся генетической диверсификации внутри этих групп. Повторное появление отдельных аминокислотных замен в различных ветвях дерева, вероятно, отражает независимое возникновение сходных замен в процессе диверсификации вируса, а не их наследование от общего предка.

В целом, распределение аминокислотных замен в филогенетическом дереве гена HN в значительной степени соответствовало иерархической структуре, выявленной при анализе полного генома, и позволило выделить дополнительные молекулярные признаки, характеризующие основные генетические группы hPIV2.

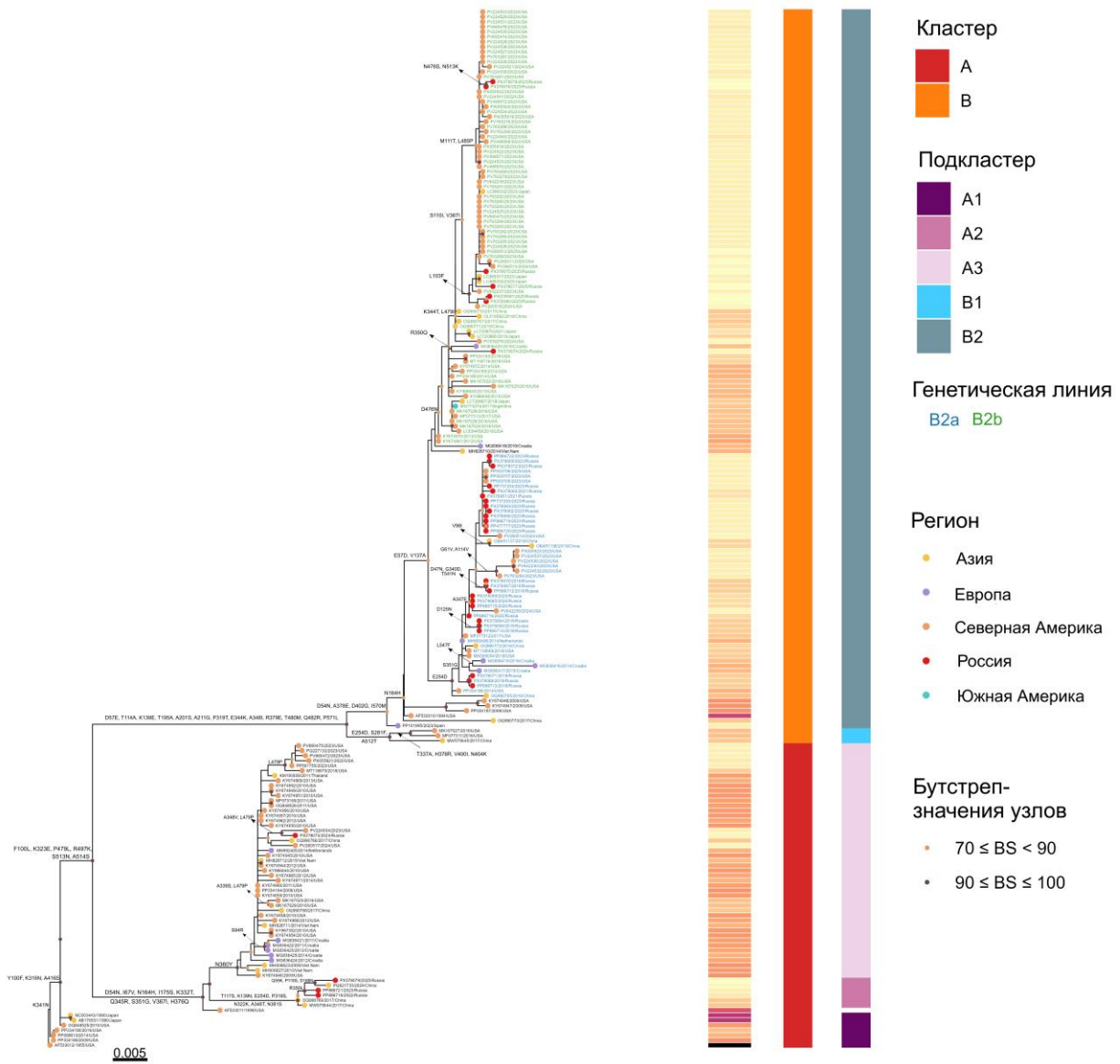


Рисунок 27. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полной последовательности гена NN 208 штаммов hPIV2. Показаны кластеры, подкластеры и генетические линии hPIV2. Обозначения соответствуют рисунку 26.

3.10.3 Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV3

Филогенетическая реконструкция, основанная на полной последовательности гена HN, продемонстрировала топологию, полностью соответствующую взаимоотношениям, полученным при анализе полного генома (Рисунок 28). Дерево, построенное на основе последовательности HN, воспроизвело ту же иерархическую структуру, которая наблюдалась в полногеномной филогении, включая четыре основных кластера (A–D), организацию подкластеров внутри кластера C, а также распределение российских штаммов среди этих генетических групп. Бутстреп-анализ подтвердил высокую статистическую поддержку основных узлов дерева, что указывает на то, что ген HN содержит достаточный филогенетический сигнал для разделения основных генетических групп hPIV3 и воспроизведения классификации, полученной при анализе полных геномных последовательностей. В частности, вновь идентифицированный кластер D, образовал отдельную и хорошо поддерживаемую монофилетическую группу в дереве, построенном на основе HN. Таким образом, топология филогении гена HN независимо подтверждает существование этого ранее неопisanного генетического кластера и поддерживает его классификацию как отдельной линии в глобальном разнообразии hPIV3.

Для дальнейшего изучения молекулярных особенностей, связанных с данной филогенетической структурой, был проведён анализ аминокислотных вариаций в белке HN в контексте реконструированной филогении. Сравнение аминокислотных последовательностей HN российских штаммов с прототипным штаммом C243 (ATCC VR-93; GenBank LC817393) выявило ряд замен, характерных для специфических кластеров, подкластеров и генетических линий.

На уровне кластеров кластер B характеризовался заменами T33I, V76I, A348V и K524R по сравнению с прототипным штаммом. В отличие от этого, вновь выделенный кластер D продемонстрировал отчетливую комбинацию замен, включая A13V, E18G, L28F, V42M, S58N, N70S, M74I, E75G, S84T, E514K и K524R, что указывает на уникальную молекулярную сигнатуру, связанную с этой генетической группой. Внутри кластера D большинство штаммов имели три дополнительные замены: K171T, Y295H и V391I, которые присутствовали у всех членов кластера, за исключением российского штамма hPIV3/Russia/SPE-RII-11534S/2024 (PX360970).

Штаммы, принадлежащие к кластеру C, который представляет собой самую большую и разнообразную группу hPIV3 в мире, имели характерный набор замен, включая I40T и M82V. Внутри этого кластера дополнительная вариация отличала отдельные подкластеры. Подкластер C1

был связан с заменами K27R и K168R, тогда как подкластер C2 определялся заменами H24N и K60Q. Подкластер C5 характеризовался заменой F73L.

Дальнейшая диверсификация наблюдалась внутри подкластера C3, где были обнаружены специфические для линии замены. Линия C3c содержала замену L28F, в то время как линия C3b, включающая три российских штамма, характеризовалась заменой A13V. Дополнительные вариации аминокислот наблюдались в доминирующей линии C3a, где несколько российских штаммов содержали замену F73L. Другие замены, обнаруженные среди штаммов, циркулирующих в этой линии, включали V47I, S283P, A22T, V191I, T23N, R62H, G387S и L163F, что указывает на продолжающуюся диверсификацию внутри этой генетической группы.

В целом, распределение аминокислотных замен в филогенетическом дереве гена HN в значительной степени отражало иерархическую структуру, выявленную при анализе полного генома, и позволило определить дополнительные молекулярные признаки, характеризующие основные генетические группы hPIV3, включая недавно описанный кластер D.

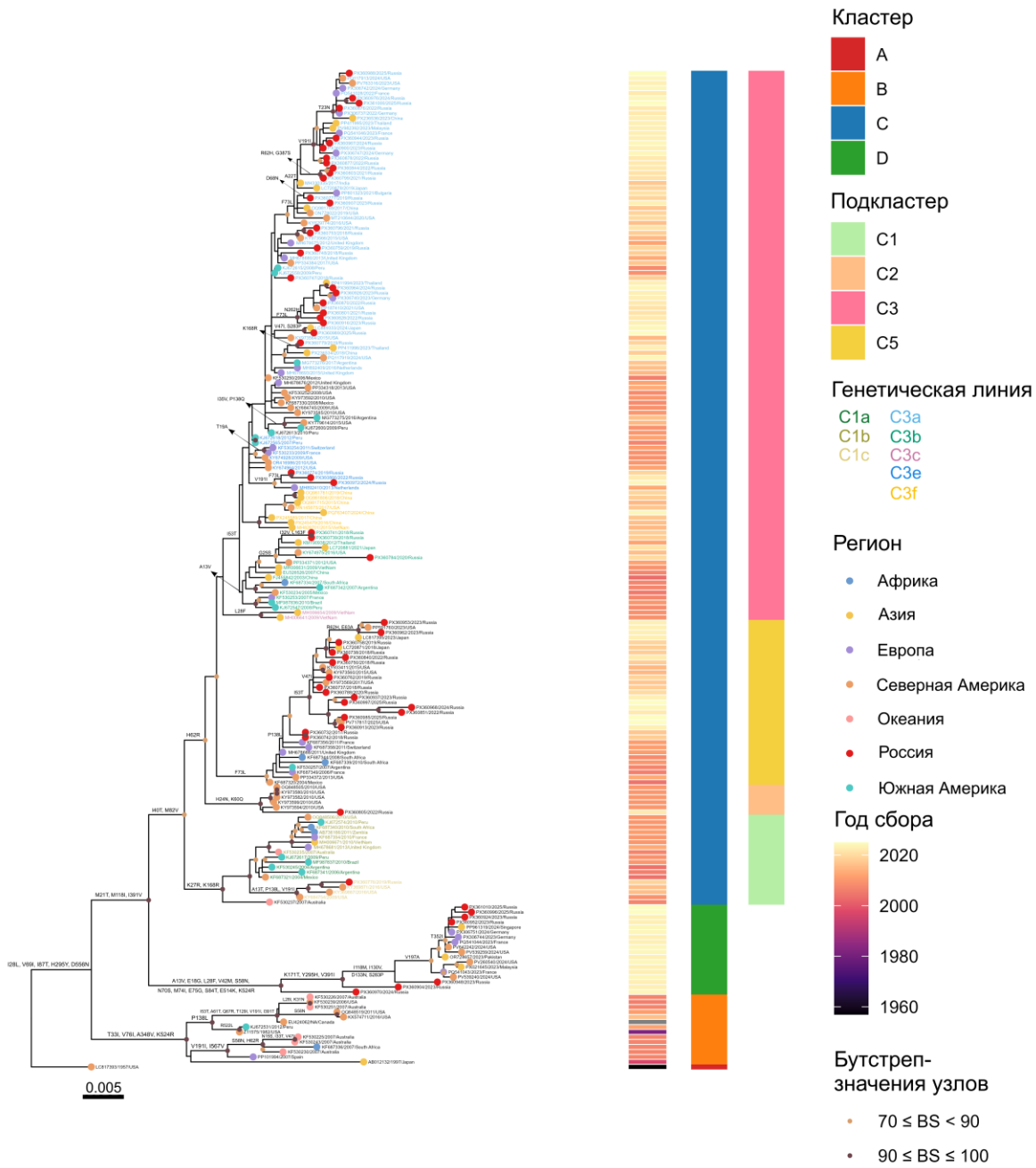


Рисунок 28. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия, построенное на основе полной последовательности гена HN 200 штаммов hPIV3. Показаны кластеры, подкластеры и генетические линии hPIV3. Обозначения соответствуют рисунку 26.

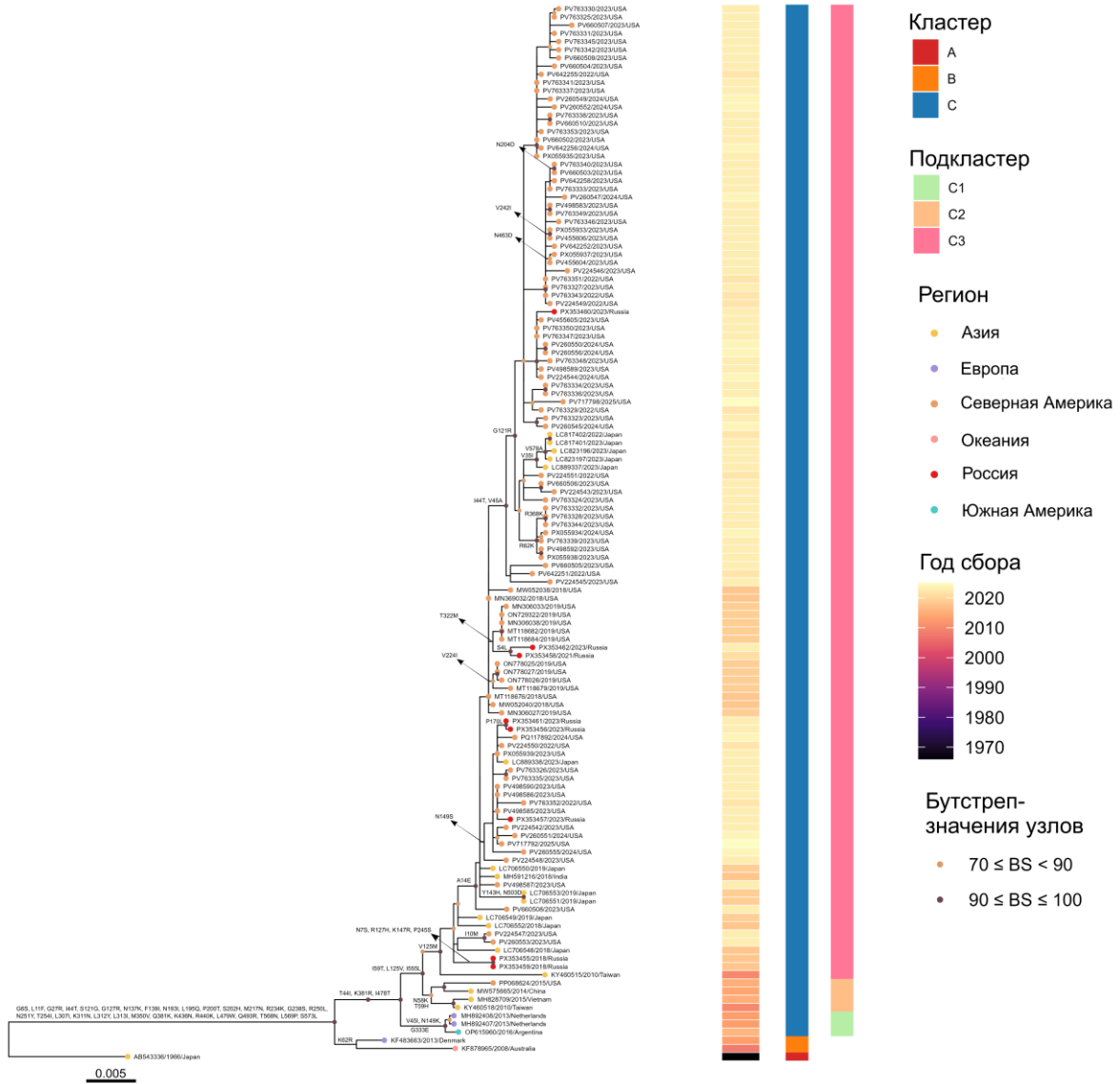
3.10.4 Филогенетический анализ гена HN и аминокислотные вариации hPIV4

Филогенетический анализ, основанный на полном гене HN, дополнительно уточнил генетические взаимосвязи внутри hPIV4 и в значительной степени совпал с топологией, выведенной из полногеномных последовательностей (Рисунок 29а и 29б). Внутри каждого подтипа дерева, построенные на основе HN, соответствовали определениям подтипов, установленным с помощью полногеномного анализа, и воспроизводили основную кластерную и подкластерную структуру, наблюдаемую на общегеномном уровне. Для hPIV4а филогения HN отражала ту же иерархическую организацию, что и общегеномный анализ, включая три основных кластера и три подкластера. Все российские изоляты сгруппировались в доминирующем подкластере hPIV4а С3, что согласуется с их положением в общегеномной филогении. Аналогично, дерево hPIV4б, построенное на основе HN, воспроизводило топологию, наблюдаемую в общегеномном анализе, определяя два основных кластера с дополнительной диверсификацией на уровне подкластеров.

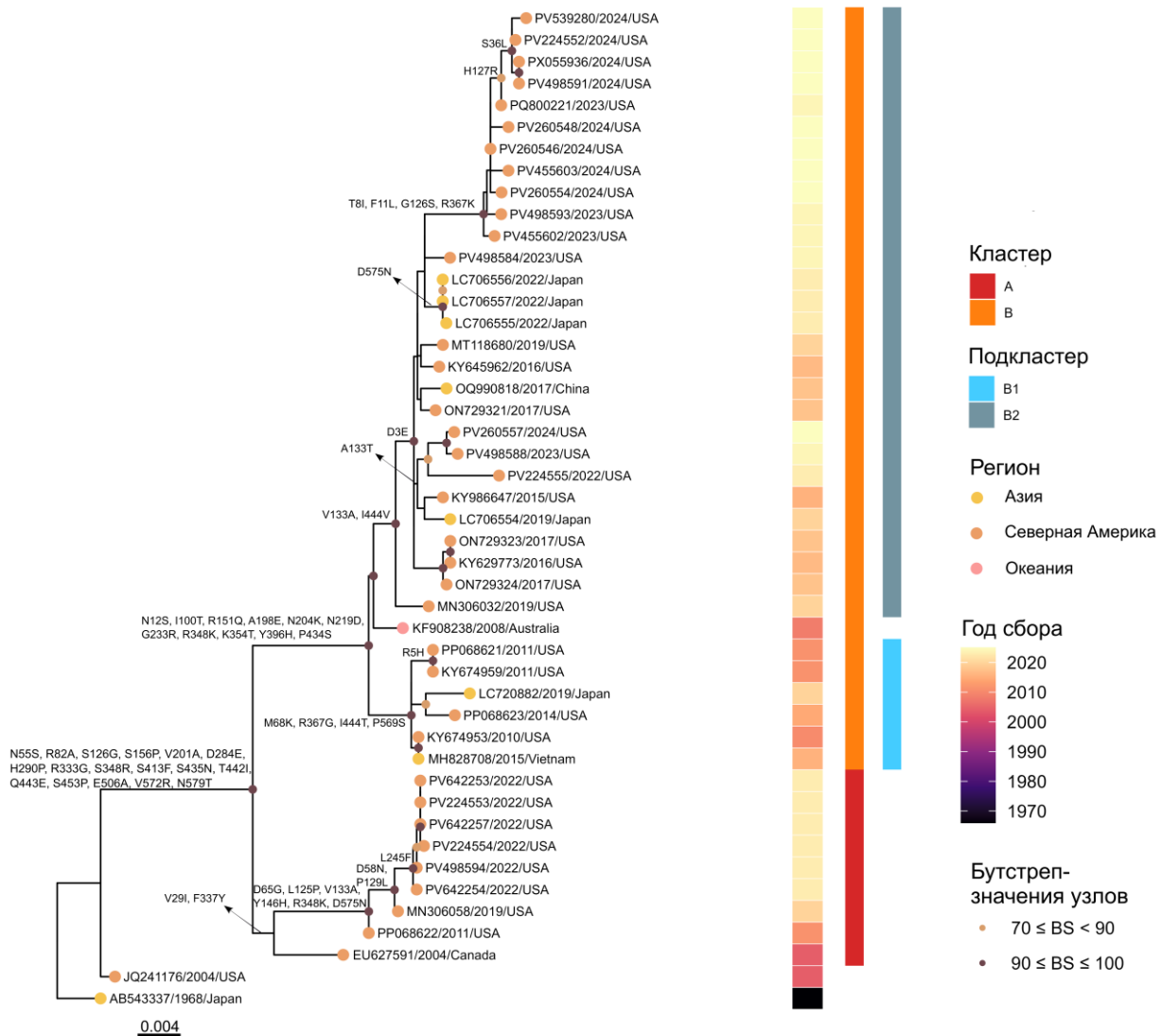
Для дальнейшей характеристики молекулярных признаков, связанных с этими филогенетическими группами, вариации аминокислот в белке HN были исследованы в связи с реконструированным филогенетическим деревом. Картирование замен по дереву выявило несколько аминокислотных паттернов, связанных со специфическими кластерами и подкластерами.

В пределах hPIV4а филогения на основе HN выявила паттерны вариаций аминокислот, в значительной степени соответствующие филогенетической структуре. Кластеры В и С характеризовались наличием собственных наборов консервативных аминокислотных замен, распределённых по различным участкам белка HN. Дополнительные вариации наблюдались на уровне каждого кластера. Кластер В преимущественно демонстрировал замен К62R. Кластер С характеризуется заменами Т44I, К381R и I478T, тогда как подкластер С1 характеризовался заменами V45I, N149K и G333E. Подкластер С2 содержит аминокислотные замены N58K и T59H. Кроме того, замены I59T, L125M и I555L являются общими для обоих подкластеров С2 и С3. Дополнительно, подкластер С3, представляющий собой самую крупную и генетически наиболее разнообразную группу, характеризовался наличием замены V125M, выявленной у всех его представителей. При этом внутри данного подкластера наблюдалось множество дополнительных замен, распределённых по нескольким внутренним ветвям, что согласуется с его дальнейшей диверсификацией.

Для hPIV4b паттерны вариаций аминокислот также были структурированы в соответствии с филогенетической организацией. Кластер А был связан с заменами V29I и F337Y. Кроме того, дополнительно демонстрировал замены D65G, L125P, V133A, Y146H, R348K и D575N во всех соответствующих штаммах этого кластера, за исключением одного канадского штамма. Кластер В характеризовался более широким набором замен, включая N12S, I100T, R151Q, A198E, N204K, N219D, G233R, R348K, K354T, Y396H и P434S. Внутри кластера В были выявлены дополнительные закономерности на уровне подкластеров. Все штаммы в подкластере В1 имели общие замены M68K, R367G, I444T и P569S, тогда как подкластер В2 постоянно демонстрировал замены V133A и I444V. Дополнительные замены наблюдались внутри отдельных генетических линий, что отражает продолжающуюся диверсификацию внутри подтипа.



(a)



(b)

Рисунок 29а и 29в. Филогенетические деревья максимального правдоподобия, построенные на основе полной последовательности гена HN 129 штаммов hPIV4а и 46 штаммов hPIV4b соответственно. Показаны кластеры, подкластеры и генетические линии каждого подтипа. Обозначения соответствуют рисунку 26.

3.11 Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN

Поскольку белок гемагглютинин-нейраминидаза (HN) является поверхностным гликопротеином, играющим центральную роль в прикреплении и проникновении вируса, распределение потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования было проанализировано по

аминокислотным последовательностям HN hPIV1–4 для характеристики вариаций в прогнозируемых паттернах гликозилирования среди циркулирующих штаммов.

Предполагаемые мотивы N-связанного гликозилирования были идентифицированы с использованием сервера NetNGlyc 1.0 на основе наличия канонического мотива Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) в аминокислотных последовательностях HN.

3.11.1 Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV1

Для белка HN вируса hPIV1 было предсказано восемь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования в аминокислотных позициях 19, 77, 173, 277, 361, 499, 504 и 511. Среди них шесть сайтов (19, 173, 277, 361, 499 и 504) были консервативны во всех проанализированных штаммах, что указывает на высокую стабильность профиля гликозилирования в большинстве геномов hPIV1, включенных в это исследование.

Вариации наблюдались в позициях 77 и 511. Предполагаемый сайт гликозилирования в позиции 511 отсутствовал в 15 российских штаммах (PP477776, PX380254, PP757765, PX380278, PX380264, PP886685, PP886677, PP886681, PP886686, PP886684, PP886691, PP886688, PP886678, PP886700, PX380255) из-за замены N511S, тогда как все остальные проанализированные последовательности сохранили этот сайт. Напротив, предполагаемый сайт гликозилирования в позиции 77 был обнаружен только в пяти штаммах: hPIV1/Russia/SPE-R11-367S/2019 (PP886693), hPIV1/Russia/SPE-R11-2570S/2020 (PP886698), hPIV1/Russia/SPE-R11-3435S/2020 (PP886699), hPIV1/Russia/SPE-R11-39S/2019 (PP886680) и hPIV1/Russia/SPE-R11-562S/2019 (PP886695), что указывает на редкость этого сайта среди проанализированных вирусов hPIV1.

Кроме того, предсказанный сайт N-связанного гликозилирования в аминокислотной позиции 8, присутствующий в референсных штаммах JQ901971 (США/1957) и AF457102 (США/1964), не был обнаружен ни в одной из проанализированных последовательностей, что предполагает, что этот мотив не сохраняется в циркулирующих в настоящее время вариантах hPIV1, включенных в набор данных.

В целом, белок HN hPIV1 показал в значительной степени консервативный паттерн предсказанного N-связанного гликозилирования с ограниченной изменчивостью, сосредоточенной в основном в позициях 77 и 511. Эти различия указывают на наличие штаммоспецифических вариаций в предсказанном профиле гликозилирования hPIV1.

3.11.2 Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV2

Анализ аминокислотных последовательностей HN hPIV2 выявил восемь предполагаемых мотивов N-связанного гликозилирования с показателями NetNGlyc выше 0,5, расположенных в аминокислотных позициях 6, 272, 284, 316, 335, 341, 501 и 517. Эти мотивы присутствовали в большинстве проанализированных последовательностей, что указывает на в целом консервативный профиль гликозилирования белка HN в hPIV2.

В дополнение к этим консервативным мотивам наблюдались штаммоспецифические вариации в предполагаемых паттернах гликозилирования. В трех близкородственных российских штаммах (hPIV2/Russia/SPE-RII-3681S/2018 (PP886712), hPIV2/Russia/SPE-RII-3681V1/2018 (PX378067) и hPIV2/Russia/SPE-RII-3681V2/2018 (PX378070)) в позиции 47 был обнаружен дополнительный предполагаемый мотив N-связанного гликозилирования. Этот мотив возник в результате замены D47N, которая вводит канонический мотив N-X-S/T гликозилирования в этот участок белка.

Дополнительные вариации были выявлены внутри подкластера A2, где три российских штамма (hPIV2/Russia/SPE-RII-4303S/2025 (PX378079), hPIV2/Russia/SPE-RII-20781S/2023 (PP886721) и hPIV2/Russia/SPE-RII-2009S/2022 (PP886718)) продемонстрировали дополнительный предсказанный мотив гликозилирования после замены T117S, что повысило оценку прогноза NetNGlyc выше порогового значения, несмотря на наличие совместимого мотива N-X-T в исходной последовательности.

Сравнение с референсными штаммами выявило различия в предсказанных профилях гликозилирования. Прототипный штамм GREER (AF533012, США/1955) не имел предсказанных мотивов гликозилирования в позициях 316 и 341, тогда как референсный штамм Toshiba (NC003443, Япония/1990) не имел мотива только в позиции 316.

В целом, белок HN hPIV2 демонстрировал в значительной степени консервативный паттерн предсказанных мотивов N-связанного гликозилирования, с ограниченными штаммоспецифическими вариациями, возникающими в основном за счет замен, которые создают или модифицируют канонические мотивы гликозилирования.

3.11.3 Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV3

Анализ аминокислотных последовательностей HN hPIV3 выявил три предсказанных мотива N-связанного гликозилирования с показателями NetNGlyc выше порогового значения, расположенных в аминокислотных позициях 308, 485 и 523. Эти мотивы были высококонсервативны среди большинства проанализированных последовательностей и соответствовали предсказанному паттерну гликозилирования, наблюдаемому в прототипном штамме C243 (ATCC VR-93; LC817393, USA/1957).

Вариации в предсказанных паттернах гликозилирования наблюдались среди штаммов, принадлежащих к недавно идентифицированному кластеру D. У всех семи штаммов, отнесенных к этому кластеру, отсутствовал предсказанный мотив гликозилирования в позиции 523. Несмотря на сохранение канонического мотива N-X-S/T в данной области, алгоритм NetNGlyc не прогнозировал гликозилирование в указанной позиции для представителей кластера D. Дополнительные вариации наблюдались в позиции 485, где у штамма hPIV3/Russia/SPE-R11-22250S/2023 (PX360948) отсутствовал предсказанный мотив гликозилирования, присутствующий в большинстве проанализированных последовательностей.

Напротив, дополнительный предсказанный мотив гликозилирования был идентифицирован в позиции 351 у четырех штаммов кластера D: hPIV3/Russia/SPE-R11-4934S/2025 (PX361010), hPIV3/Russia/SPE-R11-22556S/2023 (PX360952), hPIV3/Russia/SPE-R11-4682S/2025 (PX360996) и hPIV3/Russia/SPE-R11-19614S/2023 (PX360924).

В целом, предсказанный паттерн гликозилирования белка hPIV3 HN в значительной степени сохранился во всех штаммах, при этом кластер D демонстрировал отчетливый профиль, характеризующийся потерей предсказанного сайта гликозилирования в позиции 523 и появлением предсказанного сайта в позиции 351, что указывает на локальные вариации в профиле гликозилирования этой недавно идентифицированной генетической группы.

3.11.4 Потенциальные сайты N-связанного гликозилирования в белке HN hPIV4

Анализ аминокислотных последовательностей HN hPIV4a выявил шесть предсказанных мотивов N-связанного гликозилирования с показателями NetNGlyc выше порогового значения предсказания, расположенных в аминокислотных позициях 279, 339, 347, 433, 502 и 530. Эти мотивы были высококонсервативны у большинства штаммов hPIV4a, проанализированных в этом

исследовании, что указывает на стабильный предсказанный профиль гликозилирования белка HN в этом подтипе. Все восемь российских изолятов hPIV4 обладали полным набором предсказанных мотивов гликозилирования, за одним исключением. Штамм hPIV4/Russia/SPE-RII-27084V1/2021 (PX353458) не содержал предсказанного мотива гликозилирования в позиции 279 из-за замены T281I, которая изменила канонический мотив N-X-S/T и тем самым нарушила последовательность, необходимую для N-связанного гликозилирования. Эта замена привела к потере предсказанного мотива гликозилирования, который в остальном был консервативен среди проанализированных последовательностей hPIV4a.

В отличие от этого, анализ последовательностей hPIV4b выявил пять предсказанных мотивов N-связанного гликозилирования, расположенных в позициях 279, 339, 347, 502 и 530. Эти мотивы присутствовали почти во всех штаммах hPIV4b, включенных в набор данных, что указывает на аналогично консервативный профиль гликозилирования внутри этого подтипа. Примечательно, что предсказанный мотив гликозилирования в позиции 433, который постоянно наблюдался в штаммах hPIV4a, отсутствовал во всех проанализированных последовательностях hPIV4b. Это различие указывает на подтип-специфическую вариацию в предсказанном паттерне гликозилирования белка HN между hPIV4a и hPIV4b.

В целом, белок HN hPIV4 продемонстрировал в значительной степени консервативный набор предсказанных мотивов N-связанного гликозилирования, с лишь ограниченными вариациями, наблюдаемыми среди отдельных штаммов и между двумя вирусными подтипами.

3.12 Анализ рекомбинации

Анализ рекомбинации полных геномов hPIV выявил тип-специфические закономерности потенциальных событий рекомбинации.

Для hPIV1 и hPIV4 статистически подтвержденных событий рекомбинации обнаружено не было.

Для hPIV2 был идентифицирован один рекомбинантный штамм: hPIV2/Russia/SPE-RII-4303S/2025 (PX378079), классифицированный в подкластере A2. Основным родительским штаммом был определен китайский штамм PIV2/Kunming/0621/2024 (PQ621733, подкластер A2), тогда как предполагаемым минорным родительским штаммом был hPIV2/Russia/SPE-RII-4320S/2025 (PX378080, подкластер B2, генетическая линия B2b). Точка рекомбинации была

локализована между позициями нуклеотидов 13,586–14,528 (участок генома, кодирующий белок L).

Для hPIV3 были идентифицированы два рекомбинантных штамма, оба принадлежащие вновь охарактеризованному кластеру D. Для первого рекомбинанта, hPIV3/Russia/SPE-RII-11534S/2024 (PX360970), предполагаемым основным родительским вариантом являлся сингапурский штамм HPIV3/SG/NUHS-240508/2024 (PP961319), принадлежащий к кластеру D, тогда как минорным родительским вариантом был британский штамм HPIV3/UK/113/07/2012 (MH678676), относящийся к кластеру C, подкластер C3). Событие рекомбинации охватило область генома между позициями нуклеотидов 7103–8118 (участок генома, кодирующий белок HN). Анализ методом Bootscan подтвердил точки рекомбинации и вклад родительских штаммов по всему геному рекомбинанта (Рисунок 30). Для штамма hPIV3/Russia/SPE-RII-17999S/2023 (PX360904) предполагаемым основным родительским вариантом являлся малайзийский штамм 2311118 (PX021645), относящийся к кластеру D, тогда как минорным родительским вариантом выступал российский штамм hPIV3/Russia/SPE-RII-34131S/2021 (PX360799), принадлежащий к линии C3а кластера C. Предполагаемый рекомбинационный участок локализовался в области генома между позициями нуклеотидов 7103–7670 (участок генома, кодирующий белок HN).

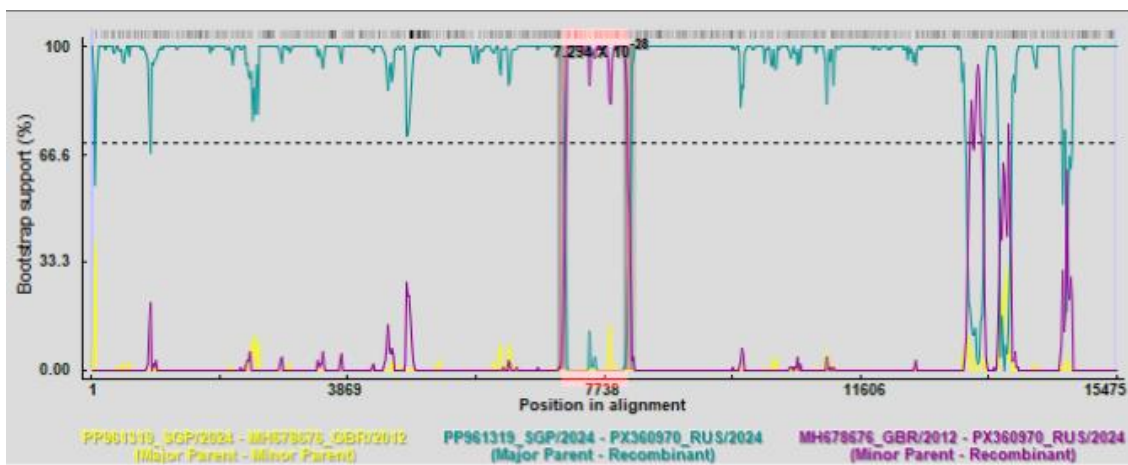


Рисунок 30. Анализ Bootscan рекомбинантного штамма hPIV3/Russia/SPE-RII-11534S/2024 (PX360970, кластер D). График показывает точки рекомбинации между основным родительским штаммом HPIV3/SG/NUHS-240508/2024 (PP961319, кластер D; синий) и дополнительным штаммом HPIV3/UK/113/07/2012 (MH678676, подкласс C3; розовый). Пунктирные линии обозначают точки рекомбинации (позиции 7103–8118). RDP v.5.64.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусы парагриппа человека (hPIV) признаны важными этиологическими агентами острых респираторных инфекций во всем мире, особенно среди детей младшего возраста, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом [4,11]. Несмотря на их клиническую значимость и глобальное бремя респираторных инфекций, вызываемых hPIV, геномная информация о вирусах, циркулирующих в России, остается крайне ограниченной [124,222,223]. До данной работы геномные данные о штаммах hPIV, обнаруженных в России, в значительной степени отсутствовали в общедоступных базах данных, а комплексные филогенетические исследования циркулирующих штаммов не проводились. В результате генетическое разнообразие и филогенетическая структура российских штаммов hPIV в глобальном контексте оставались плохо изученными.

Полученные в данном исследовании данные эпидемиологического надзора предоставляют важную информацию о распространенности hPIV в Санкт-Петербурге. В течение периода исследования с 2017 по 2025 год инфекции hPIV составляли значительную долю выявленных респираторных вирусных инфекций среди госпитализированных пациентов с острыми респираторными заболеваниями. Среди четырех типов hPIV3 представлял собой доминирующий тип, на долю которого приходилось почти три четверти всех выявленных случаев, в то время как hPIV1, hPIV2 и hPIV4 выявлялись значительно реже [224–226].

Выраженное преобладание hPIV3, составляющего почти три четверти всех выявленных случаев, согласуется с результатами многочисленных эпидемиологических исследований, проведенных в Северной Америке, Европе и Азии, в которых hPIV3 стабильно определяется как доминирующий тип, ответственный за большинство инфекций [36,120,122,128]. Долгосрочные эпидемиологические наблюдения показали, что циркуляция hPIV3 характеризуется ежегодной эпидемической активностью, в отличие от hPIV1 и hPIV2, для которых более типичны двухлетние или нерегулярные циклы циркуляции [10,106]. Данные различия в эпидемиологическом поведении, вероятно, способствуют более высокой суммарной частоте выявления hPIV3 в условиях госпитального эпидемиологического надзора.

Выявленные в настоящем исследовании сезонные закономерности также в значительной степени соответствуют хорошо установленным глобальным тенденциям. В частности, пик активности hPIV3 в весенний период с сохранением циркуляции в летние месяцы [225] согласуется с многочисленными сообщениями о ежегодных вспышках hPIV3 в период с марта по июль

[10,36,120,127,133,227]. В отличие от этого, hPIV1 и hPIV2 выявлялись реже и демонстрировали преимущественную активность в осенне-зимний период [224], что соответствует ранее описанным сезонным закономерностям, включая двухлетние осенние пики для hPIV1 и более вариабельную зимнюю циркуляцию для hPIV2 [10,106,122,227]. Относительно низкая частота выявления и менее выраженная сезонность hPIV4, наблюдаемая в данном исследовании [226], также согласуются с предыдущими данными, согласно которым данный тип выявляется реже и остаётся недостаточно изученным [10,36,122].

Возрастное распределение выявленных случаев, полученное в настоящем исследовании, при рассмотрении по отдельным типам в целом согласуется с установленными эпидемиологическими представлениями об инфекциях hPIV. Преобладание детей младшего возраста среди случаев hPIV1, hPIV2 и hPIV4 соответствует классическому профилю этих инфекций, при котором вирусы парагриппа поражают преимущественно младенцев и детей раннего возраста [122,128,227]. Для hPIV3, напротив, значительная доля выявлений приходилась на взрослых и лиц пожилого возраста.

В совокупности, выявленные в данном исследовании эпидемиологические закономерности в целом соответствуют глобальным данным о циркуляции hPIV, одновременно отражая влияние дизайна эпидемиологического надзора, структуры выборки и возможных взаимодействий между различными типами вируса. Полученные результаты создают основу для интерпретации молекулярно-генетических и филогенетических данных, представленных в настоящей работе.

Ключевым методологическим результатом данной работы была разработка мультиплексных панелей праймеров с перекрывающимися ампликонами, предназначенных для полногеномной амплификации hPIV1, hPIV2 и hPIV3 непосредственно из клинических респираторных образцов. Данные панели основаны на дизайне перекрывающихся ампликонов, охватывающих весь геном вируса, что обеспечивает надёжное получение практически полных геномных последовательностей.

Исторически молекулярная характеристика hPIV преимущественно основывалась на секвенировании отдельных участков генома, чаще всего генов HN и F, ввиду их функциональной значимости и вариабельности [147,148]. Несмотря на то, что такие подходы позволили получить важные данные о генетическом разнообразии вирусов, использование отдельных генов ограничивает возможность комплексного анализа геномной вариабельности и сопоставления

эволюционных изменений между различными участками вирусного генома [90,160]. С развитием технологий NGS и расширением задач геномного надзора всё более широкое применение получают подходы, основанные на полногеномном секвенировании hPIV [18,20,21]. Разработанные в настоящем исследовании панели праймеров основаны на стратегии перекрывающихся ампликонов, аналогичной подходам, ранее успешно применённым для геномного надзора за различными РНК-вирусами, включая SARS-CoV-2, hRSV, hMPV и hPIV [21,162–166]. Использование подобного дизайна обеспечивает равномерное покрытие генома и снижает вероятность выпадения отдельных геномных участков при секвенировании.

Оценка разработанных панелей праймеров продемонстрировала их высокую аналитическую эффективность. Используемая стратегия амплификации обеспечивала равномерное покрытие генома с минимальным количеством пробелов. В большинстве образцов достигалось покрытие 90–100% генома при глубине $\geq 20\times$, что обеспечивало надёжную реконструкцию консенсусных последовательностей. В большинстве случаев около 95% прочтений успешно выравнивались на референсные геномы, что свидетельствует о высокой эффективности и специфичности амплификации вирусной РНК. Важно отметить, что панели демонстрировали стабильную эффективность амплификации как для филогенетически разнообразных штаммов, так и при различных уровнях вирусной нагрузки, что подтверждает их пригодность для задач геномного надзора. Успешное секвенирование референсных штаммов, представляющих отдалённые филогенетические линии, дополнительно продемонстрировало способность разработанных праймеров амплифицировать генетически дивергентные геномы hPIV [224]. При этом аналитическая чувствительность панелей различалась между типами hPIV. Для hPIV1 и hPIV3 высокий уровень восстановления генома сохранялся при более широком диапазоне значений C_t , тогда как для hPIV2 достижение $\geq 90\%$ покрытия генома требовало более высокой вирусной нагрузки. Это различие следует интерпретировать с учётом особенностей ампликонной схемы hPIV2: при относительно небольшом числе ампликонов потеря одного фрагмента уже может приводить к заметному снижению доли покрытого генома. В то же время даже при частичном снижении общего покрытия наиболее информативные участки генома, включая гены F и HN, оставались надёжно представленными в данных секвенирования. Таким образом, результаты не указывают на сниженную работоспособность панели hPIV2, а отражают более

высокую зависимость получения почти полного генома от вирусной нагрузки и качества РНК-матрицы.

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные панели праймеров являются эффективным и надёжным инструментом для полногеномного секвенирования hPIV1–3. Использование данных панелей позволило получить 105 полных геномных последовательностей hPIV1, 37 — hPIV2 и 303 — hPIV3, из клинических образцов, собранных в Санкт-Петербурге. Представленные в настоящем исследовании данные являются первой комплексной коллекцией полных геномов hPIV1–3, полученных в России и депонированных в публичной базе данных NCBI GenBank, что существенно расширяет глобальный набор данных, доступный для сравнительных молекулярных исследований. Полученные последовательности представляют собой важный ресурс для дальнейших исследований генетического разнообразия, передачи и эволюции вирусов парагриппа человека.

Важно отметить, что к настоящему времени число опубликованных специализированных ампликонных панелей для полногеномного секвенирования hPIV остаётся относительно ограниченным, а в Российской Федерации таких панелей до настоящего времени опубликовано не было [18,20,21]. В этом контексте разработанные панели дополняют существующие инструменты для геномного мониторинга hPIV и расширяют возможности получения полных геномных последовательностей непосредственно из клинического материала.

Несмотря на указанные преимущества, следует отметить, что ампликонные подходы секвенирования остаются зависимыми от вирусной нагрузки и соответствия праймер–матрица. Как показано в ряде исследований, образцы с более высокими значениями Ct могут приводить к снижению полноты покрытия генома, а несовпадения между праймерами и эволюционирующими вирусными последовательностями могут приводить к неравномерной амплификации отдельных участков генома [18,21,162]. Тем не менее, в настоящем исследовании разработанные панели продемонстрировали стабильную эффективность в широком диапазоне значений Ct, что указывает на их пригодность для рутинных задач эпидемиологического надзора.

Хотя панели праймеров были успешно разработаны для hPIV1–3, для hPIV4 потребовалась иная стратегия секвенирования. Это связано с генетической гетерогенностью данного типа, представленного подтипами hPIV4a и hPIV4b, при отсутствии предварительной информации о

циркулирующем подтипе, что затрудняет разработку универсальной панели праймеров без риска снижения эффективности амплификации. В связи с этим для получения геномов hPIV4 был использован метагеномный подход, основанный на технологии SMART-9N, позволяющей проводить амплификацию вирусной РНК, независимую от последовательности генома и не требующую использования вирус-специфичных праймеров [172,173]. В отличие от таргетного ампликонного секвенирования, данный подход не зависит от предварительного подбора праймеров к конкретному подтипу вируса, что делает его методологически оправданным при анализе hPIV4 в условиях неопределённой подтиповой принадлежности образцов. В настоящем исследовании применение SMART-9N позволило успешно восстановить полные геномные последовательности всех восьми изолятов hPIV4. Полученные данные характеризовались полным покрытием вирусного генома без участков с нулевым покрытием, а медианная глубина покрытия была достаточной для надёжной реконструкции консенсусных последовательностей. Отсутствие выраженного снижения покрытия на терминальных участках или внутри кодирующих областей указывает на равномерное восстановление геномов. Таким образом, использование SMART-9N оказалось эффективной стратегией для полногеномного секвенирования hPIV4 из культивированных изолятов и обеспечило получение данных, пригодных для последующего молекулярного и филогенетического анализа.

В дополнение к полногеномному секвенированию непосредственно из клинического материала, данное исследование включало систематические эксперименты по выделению вируса, направленные на разработку надёжных протоколов культивирования для различных типов hPIV, оценку возможного возникновения адаптационных изменений при культивировании, а также получение биологических штаммов вируса для последующих экспериментальных исследований. Успешное выделение вирусных изолятов было достигнуто для ряда образцов, представляющих все четыре типа hPIV, с использованием клеточных линий LLC-MK2 и MA-104. Характерные цитопатические эффекты, включая округление клеток, образование синцитиев и прогрессирующее разрушение монослоя, свидетельствовали о продуктивной вирусной репликации *in vitro*.

Выделение вируса в клеточной культуре остаётся классическим, но технически сложным методом, эффективность которого в значительной степени зависит от выбора клеточной линии, вирусной нагрузки и условий культивирования [92,210]. Традиционно первичные культуры клеток почки обезьян (РМК) считаются наиболее чувствительной системой для выделения hPIV,

особенно для hPIV1 и hPIV2, однако их рутинное использование ограничено высокой стоимостью, вариабельностью и склонностью к контаминации [29,149,206,207,228]. В противоположность этому, перевиваемые клеточные линии, такие как LLC-MK2, широко применяются в рутинной вирусологической практике благодаря их воспроизводимости и способности поддерживать репликацию различных типов hPIV, хотя их чувствительность при первичном выделении несколько ниже.

В настоящем исследовании использование перевиваемых клеточных линий обезьян LLC-MK2 в сочетании с клетками MA-104 обеспечило надёжную и практичную систему для выделения вируса. В соответствии с ранее опубликованными данными, клетки LLC-MK2 эффективно поддерживали репликацию hPIV1–3, при этом наблюдались различия в эффективности выделения между типами. Сниженная частота выделения вирусов hPIV2 и hPIV4 согласуются с ранее полученными результатами, указывающими на сниженную чувствительность стандартных клеточных систем для этих типов, а также на более позднее или слабо выраженное развитие цитопатического эффекта [205,229].

Условия культивирования также играют ключевую роль в успешности выделения вируса. Ранее было показано, что добавление экзогенных протеаз, таких как трипсин, в культуральную среду необходимо для эффективного расщепления белка слияния вируса и усиления вирусной репликации [230]. В настоящем исследовании использование поддерживающей среды, содержащей трипсин в заданной концентрации, обеспечило продуктивную инфекцию для всех типов, что соответствует установленным протоколам. Незначительные различия в температуре и продолжительности инкубации, описанные в литературе (как правило, 32–37°C и до 7–14 дней), могут влиять на кинетику репликации и чувствительность выявления [205,228–230]; однако условия, применённые в данном исследовании, оказались достаточными для воспроизводимого выделения вируса и чёткого развития цитопатического эффекта в ожидаемые сроки.

Эксперименты по выделению вируса также позволили оценить биологические характеристики полученных изолятов. В то время как изоляты hPIV1–3 демонстрировали выраженную гемагглютинирующую активность с эритроцитами, все культивированные изоляты hPIV4 оказались гемагглютинин-отрицательными в условиях проведённого эксперимента, даже при использовании различных типов эритроцитов (морской свинки, человека и курицы) [226]. Подобные наблюдения ранее описаны в литературе, однако механизмы отсутствия

гемагглютинирующей активности у hPIV4 до конца не установлены [113,124]. Использование реакции гемагглютинации в сочетании с молекулярным подтверждением отражает классический, но взаимодополняющий подход к идентификации вирусов, при котором интегрируются фенотипические и генотипические методы. В то же время отсутствие гемагглютинирующей активности у hPIV4 подчёркивает известные ограничения методов, основанных на НА, и акцентирует важность применения молекулярных подходов для надёжной идентификации данного типа. Антигенная специфичность типовых изолятов была подтверждена в реакции торможения гемагглютинации (РТГА): крысиные поликлональные антисыворотки демонстрировали значимые гомологичные титры (от 1:80 до 1:640 для hPIV1–hPIV3). Наблюдавшаяся при этом слабая перекрёстная реактивность между hPIV1 и hPIV3 при полном отсутствии гетерологичных реакций для hPIV2 согласуется с их таксономическим положением: hPIV1 и hPIV3 относятся к роду *Respirovirus*, тогда как hPIV2 — к роду *Orthorubulavirus*. Поскольку изоляты hPIV4 не обладали гемагглютинирующей активностью и не могли быть охарактеризованы в РТГА, специфичность соответствующей антисыворотки была подтверждена в реакции нейтрализации на клетках МА-104, где она подавляла развитие цитопатического действия гомологичного вируса до разведения 1:320. Более того, инфекционная активность типовых изолятов была дополнительно количественно охарактеризована методом TCID₅₀ с титрами от 8,45 до 9,95 log₁₀ TCID₅₀/мл. Наиболее высокий инфекционный титр был зарегистрирован для изолята hPIV3 (9,95 log₁₀), что согласуется с наибольшими значениями гемагглютинирующей активности, отмеченными для данного типа.

Успешное выделение штаммов hPIV из клинического материала представляет собой важное практическое достижение этого исследования. Все полученные изоляты были депонированы в коллекцию вирусов гриппа и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, а репрезентативные типовые штаммы четырёх типов hPIV вместе с соответствующими специфическими крысиными поликлональными антисыворотками были депонированы в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (номера ГКВ 3039-3041, 3083), тем самым обеспечив доступность биологического материала для последующих вирусологических, молекулярных и эпидемиологических исследований.

Сравнение полногеномных последовательностей, полученных непосредственно из клинических образцов, с последовательностями соответствующих изолятов после второго пассажа выявило лишь минимальные различия — от 1 до 6 нуклеотидных замен на геном, большинство из которых были синонимичными. Несинонимичные замены носили спорадический характер, затрагивали преимущественно белки Р, HN и L и были выявлены лишь в части пар (8 из 20 для hPIV1, 2 из 7 для hPIV2 и 6 из 9 для hPIV3); при этом ни одна из них не повторялась у нескольких независимых изолятов одного типа. Отсутствие воспроизводимых паттернов аминокислотных замен свидетельствует против направленной адаптации вируса к клеточной культуре в условиях краткосрочного пассирования — в отличие от хорошо описанных воспроизводимых адаптивных замен, характерных, например, для культивирования вирусов гриппа [231,232]. Несмотря на то что часть замен локализовалась в гене HN, кодирующем основной поверхностный гликопротеин, их единичный и невоспроизводимый характер указывает скорее на случайное происхождение, чем на системную селекцию, обусловленную культивированием. Полученные результаты подтверждают высокую генетическую стабильность геномов hPIV при краткосрочном культивировании и обосновывают использование последовательностей культивированных изолятов в качестве надёжных представителей исходных клинических вирусов для последующих филогенетических и молекулярно-эпидемиологических исследований.

Таким образом, сочетание полногеномного секвенирования непосредственно из клинического материала, успешного выделения вируса и применения комплементарных стратегий амплификации позволило сформировать комплексный геномный набор данных, охватывающий все четыре типа hPIV, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Наличие этих новых геномных последовательностей создало основу для детального анализа филогенетической структуры и глобального генетического разнообразия вирусов парагриппа человека.

Интерпретация филогенетических взаимоотношений, выявленных в настоящем исследовании, проводилась в контексте ранее описанных филогенетических структур hPIV1–4 [16,18,30,91,152,188]. Анализ основывался на сочетании топологии филогенетического дерева, значений бутстреп-поддержки и генетических расстояний (p-distance) [16,18,188].

Исторически молекулярно-эпидемиологические исследования hPIV преимущественно основывались на анализе отдельных геномных регионов, прежде всего гена HN [16,153,186]. Именно HN-основанные филогенетические схемы стали основой большинства современных

представлений о генетическом разнообразии hPIV1–4. Несмотря на то что более поздние исследования начали активно использовать полногеномное секвенирование [18,19,160], число доступных полных геномов hPIV по-прежнему остаётся существенно меньшим по сравнению со многими другими респираторными РНК-вирусами. В связи с этим полученные в настоящем исследовании полногеномные последовательности позволили дополнить существующие данные о глобальном генетическом разнообразии hPIV и охарактеризовать российские штаммы в контексте уже известных филогенетических групп.

Для hPIV1 ранее опубликованные исследования, основанные как на анализе гена HN, так и на полных геномах, описывали несколько основных филогенетических клайдов [17–19,31,90,186–188]. Одни из первых исследований, выполненных Mizuta и соавт., выявили существование двух основных генетических групп hPIV1 на основании анализа HN-последовательностей японских штаммов [149]. Позднее Beck и соавт. показали сходную топологию деревьев, построенных как по HN-гену, так и по полным геномам, и описали несколько филогенетических клайдов современных вирусов hPIV1 [90]. Аналогичные результаты были получены Bose и соавт. при полногеномном анализе hPIV1, а также в более поздних исследованиях китайских, хорватских и немецких штаммов, в которых циркулирующие вирусы hPIV1 также подразделялись на несколько филогенетических клайдов [19,186–188]. В частности, в исследовании Zhu и соавт., основанном на анализе полных геномов и HN-последовательностей, hPIV1 был разделён на четыре основные клайды A–D [18]. Полученные в настоящем исследовании результаты хорошо согласуются с данной филогенетической структурой. Полногеномный анализ также выявил четыре основные клайды hPIV1 (A–D), внутри которых наблюдалась дальнейшая генетическая диверсификация. Большинство российских штаммов относилось к клайду C, представляющему наиболее многочисленную и генетически разнообразную группу современных вирусов hPIV1. Дополнительно российские штаммы выявлялись в клайдах B и D, что свидетельствует о коциркуляции нескольких генетически различающихся вариантов hPIV1 в Санкт-Петербурге в течение периода наблюдения. При этом российские последовательности группировались совместно со штаммами из США, Китая, Японии, Франции, Аргентины и других стран, что отражает принадлежность российских вирусов к глобально циркулирующей популяции hPIV1. Следует отметить, что наиболее ранние референсные последовательности не формировали единую монофилетическую группу, вследствие чего применение иерархической схемы “кластер–

подкластер” для hPIV1 представлялось менее корректным с точки зрения топологии дерева. Вероятно, именно с этим связано то, что в большинстве предшествующих исследований hPIV1 основные филогенетические группы также описывались как отдельные клайды без выделения более высокого уровня кластерной организации [18,19,90,187,188]. Вместе с тем уровни генетической дивергенции между выделенными клайдами соответствовали диапазонам генетического расстояния, которые в ранее опубликованных исследованиях применялись для выделения подкластеров hPIV [16,18]. Дополнительно внутри клайдов С и D в настоящем исследовании были выделены отдельные генетические линии, формировавшие устойчивые монофилетические группы и характеризовавшиеся соответствующими уровнями генетической дивергенции.

Для hPIV2 ранние молекулярно-эпидемиологические исследования также преимущественно основывались на анализе HN-гена [91,150,153,154,189,190]. Одним из первых исследований Terrier и соавт. продемонстрировали существование двух генетически различающихся групп hPIV2 на основании анализа HN- и F-последовательностей [153]. Позднее Almajhdі и соавт. предложили разделение hPIV2 на четыре генетические группы (G1–G4) на основе анализа HN-гена [150]. Данная схема впоследствии широко использовалась в ряде молекулярно-эпидемиологических исследований, включая работы Santak и соавт., показавших согласованность филогенетических деревьев, построенных по генам HN и F [154,189]. Более поздние исследования, выполненные в Германии и Китае, дополнительно использовали сочетание топологии дерева, бутстреп-поддержки и p-distance для выделения филогенетических групп hPIV2 [91,188]. В частности, Feng и соавт. на основании анализа глобального набора HN-последовательностей выделили два основных кластера hPIV2 с дальнейшим подразделением на линии и подлинии, используя статистически обоснованные пороговые значения генетических расстояний [91]. Полученные в настоящем исследовании полногеномные результаты в целом хорошо согласуются с данной филогенетической структурой, представленной Feng и соавт. Полногеномный анализ также выявил два основных кластера hPIV2 (А и В), внутри которых определялись несколько подкластеров и генетических линий. Кластер А подразделялся на три подкластера (А1–А3), тогда как наиболее многочисленный кластер В включал два подкластера (В1 и В2). Большинство российских штаммов относилось к наиболее многочисленному кластеру В и группировалось совместно со штаммами из США, Китая, Хорватии, Нидерландов, Японии, Вьетнама и Аргентины.

Такая структура свидетельствует об отсутствии выраженной географической изоляции российских вирусов и отражает глобальную коциркуляцию нескольких генетических линий hPIV2, ранее также описанную Feng и соавт. [91]. Кроме того, наблюдаемое распределение российских штаммов между несколькими линиями внутри кластера В указывает на одновременную циркуляцию генетически различающихся вариантов hPIV2 в исследуемый период.

Для hPIV3 полученные результаты в значительной степени согласуются с ранее описанной HN-основанной филогенетической структурой, первоначально предложенной Мао и соавт. [16]. В данной работе hPIV3 подразделялся на три основных кластера А–С, при этом наиболее генетически разнообразный кластер С дополнительно разделялся на несколько подкластеров и генетических линий [16]. В дальнейшем данная схема была расширена Almajhdi и соавт., которые описали дополнительный подкластер С5 и уточнили структуру линий внутри С1 и С3 [30]. Позднее исследования, выполненные в Аргентине, Испании, Китае, Южной Корее, Кении и других странах, продолжили использовать данную HN-основанную филогенетическую структуру и сообщили о дальнейшей диверсификации внутри кластера С [32,33,191–195]. Полногеномные исследования Vose и соавт., а также Zhu и соавт. в целом подтвердили общую филогенетическую структуру и преобладание кластера С среди современных циркулирующих штаммов hPIV3 [18,19]. Полученные в настоящем исследовании результаты в целом подтвердили ранее описанную филогенетическую структуру hPIV3, включая разделение вирусов на кластеры А–С и доминирующее положение кластера С среди современных циркулирующих штаммов. Следует отметить, что в ранее опубликованных HN-основанных исследованиях внутри подкластера С3 дополнительно выделялась генетическая линия С3d [32,195]. Однако в настоящем исследовании соответствующие полногеномные последовательности не формировали самостоятельную устойчивую монофилетическую группу, несмотря на соответствие критериям генетической дистанции. В связи с этим линия С3d не была выделена в качестве отдельной филогенетической группы, тогда как обозначения остальных линий (С3а, С3b, С3с, С3е и С3f) были сохранены для обеспечения сопоставимости с ранее опубликованными исследованиями. Вместе с тем расширенный набор полногеномных последовательностей позволил дополнительно выявить новую хорошо поддержанную филогенетическую группу, обозначенную в настоящем исследовании как кластер D. Большинство российских штаммов hPIV3 относилось к кластеру С, преимущественно к линиям внутри подкластеров С3 и С5. Наиболее распространённой среди

российских последовательностей являлась линия С3а, ранее неоднократно описывавшаяся как одна из доминирующих современных линий hPIV3 [30,33]. Российские штаммы формировали филогенетические группы совместно с последовательностями из США, Китая, Японии, Франции, Аргентины, Южной Африки и других стран, что свидетельствует о глобальном распространении данных линий и отсутствии выраженной географической кластеризации.

Кластер D включал российские штаммы, а также последовательности из Франции, Германии, Пакистана, Сингапура, Малайзии и США, что свидетельствует о его циркуляции в различных географических регионах [225]. Примечательно, что Zhu и соавт. в более позднем полногеномном исследовании интерпретировали сходную филогенетическую группу как дополнительный подкластер С6 внутри кластера С [18]. Однако результаты настоящего исследования указывают на то, что данная группа формирует отдельную устойчивую монофилетическую ветвь с высокими значениями бутстреп-поддержки и уровнями генетической дивергенции, превышающими ранее предложенные пороговые значения для определения кластеров hPIV3 [16]. В связи с этим полученные данные поддерживают интерпретацию данной группы как отдельного генетического кластера, а не дополнительного подкластера внутри С. Дополнительным аргументом в пользу выделения hPIV3 кластера D служило наличие большого числа кластер-специфичных аминокислотных замен, распределённых по нескольким вирусным белкам. Примечательно, что наибольшее число кластер-специфичных аминокислотных замен выявлялось в белках Р и L, входящих в состав вирусного репликационно-транскрипционного комплекса, тогда как дополнительный набор характерных замен определялся в поверхностных гликопротеинах HN и F. Важно подчеркнуть, что для выявленных кластер-специфичных аминокислотных замен в настоящее время не описано подтверждённого влияния на биологические свойства hPIV3. Тем не менее наличие большого числа групп-специфичных аминокислотных маркеров, затрагивающих сразу несколько генов, дополнительно подтверждает генетическую обособленность кластера D и указывает на его длительную независимую эволюцию. Вероятно, формирование данной группы отражает продолжающуюся эволюцию и недавнюю диверсификацию современных вариантов hPIV3, поскольку большинство последовательностей, относящихся к кластеру D, были выявлены именно в последние годы в различных географических регионах [225].

Для hPIV4 результаты настоящего исследования также в целом согласуются с ранее опубликованными молекулярно-эпидемиологическими данными [18,152,160,188]. Ранние исследования hPIV4 преимущественно были сосредоточены на различении двух основных подтипов — hPIV4a и hPIV4b — на основании анализа отдельных генов [112,142,155,196–199]. Позднее с увеличением числа доступных последовательностей были предложены более детализированные филогенетические схемы. Так, анализа HN-последовательностей китайских штаммов позволил подразделить hPIV4a на несколько кластеров и линий [152]. В исследовании немецких штаммов hPIV4 аналогично использовались топология дерева, бутстреп-поддержка и *p-distance* для определения филогенетических клайдов [188]. Более поздние полногеномные исследования Zhu и соавт. также предложили разделение hPIV4a и hPIV4b на несколько клайдов A–C с дальнейшей внутренней диверсификацией [18]. Полученные в настоящем исследовании полногеномные данные подтвердили чёткое разделение hPIV4 на два основных подтипа — hPIV4a и hPIV4b. Внутри hPIV4a были выделены три основные филогенетические кластера (A–C), при этом наиболее многочисленный кластер C дополнительно подразделялся на несколько подкластеров (C1–C3), что в целом соответствует ранее опубликованным HN- и полногеномным филогенетическим исследованиям hPIV4 [18,152]. Все российские изоляты относились к hPIV4a и распределялись внутри современного крупного кластера данного подтипа. При этом российские последовательности формировали группы совместно со штаммами из США, Японии, Тайваня, Индии и других стран, что указывает на их принадлежность к глобально циркулирующей популяции hPIV4a.

Несмотря на то, что выделение филогенетических групп для четырёх типов hPIV в настоящем исследовании основывалось преимущественно на анализе топологии дерева, бутстреп-поддержки и ранее определенных пороговых значениях генетического расстояния, дополнительным подтверждением устойчивости этих групп служило наличие групп-специфичных несинонимичных аминокислотных замен. Для всех четырёх типов hPIV были выявлены консервативные аминокислотные маркеры, характерные для отдельных филогенетических групп и сохраняющиеся у всех входящих в них вирусов. При этом более высокие уровни филогенетической организации (кластеры и клайды) характеризовались большим числом таких замен по сравнению с подкластерами и генетическими линиями, что может отражать более длительную независимую эволюцию данных групп. Примечательно, что наибольшее число

групп-специфичных аминокислотных замен выявлялось в генах HN, P и L, тогда как для более консервативных генов число подобных маркеров было существенно ниже. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделенные филогенетические группы не только отражают нуклеотидную дивергенцию, но и характеризуются собственными наборами аминокислотных изменений. При этом для большинства выявленных групп-специфичных замен в настоящее время отсутствуют экспериментальные данные, подтверждающие их влияние на биологические свойства hPIV. Поэтому данные замены следует рассматривать прежде всего как молекулярные маркеры филогенетических групп, а их возможное функциональное значение требует дальнейшей проверки с использованием структурных и экспериментальных подходов.

Таким образом, результаты настоящего исследования в целом подтверждают ранее описанные филогенетические структуры hPIV1–4, первоначально выявленные преимущественно на основе анализа HN-гена, и демонстрируют их воспроизводимость при использовании полногеномных последовательностей. В совокупности полученные данные показывают, что вирусы парагриппа человека, циркулирующие в России, являются частью глобально взаимосвязанной вирусной популяции и характеризуются значительным генетическим разнообразием во всех четырёх типах. Наличие множества кластеров, подкластеров, клайдов и генетических линий отражает сложную популяционную структуру hPIV. Полученные результаты также подчёркивают важность применения полногеномного секвенирования для точной характеристики циркулирующих штаммов и мониторинга появления новых генетических вариантов hPIV.

Кроме того, филогенетические деревья, реконструированные на основе полных последовательностей гена HN, продемонстрировали топологию, в целом согласующуюся с результатами, полученными при анализе полных геномов. Основные кластеры, подкластеры, клайды и генетические линии, выявленные в филогении на основе полногеномных последовательностей, воспроизводились и на деревьях, построенных по гену HN, что подтверждает наличие в гене HN достаточного филогенетического сигнала для разрешения основных эволюционных групп вирусов парагриппа человека. Картирование аминокислотных замен на реконструированные филогенетические деревья позволило выявить ряд вариантов в белке HN, специфичных для выделенных филогенетических групп. Хотя большинство аминокислотных остатков оставались высоко консервативными вследствие функциональных

ограничений, ограниченное число замен было связано с конкретными филогенетическими группами.

Помимо аминокислотных замен, N-связанное гликозилирование является важной посттрансляционной модификацией поверхностных гликопротеинов вируса, способной влиять на сворачивание белка, связывание с рецепторами и взаимодействие с иммунной системой хозяина [233,234]. Для hPIV1 преобладание консервативных предсказанных сайтов N-связанного гликозилирования указывает на наличие сильных функциональных ограничений, действующих на белок HN, тогда как вариабельность в позициях 77 и 511 отражает продолжающуюся диверсификацию отдельных участков поверхностного гликопротеина. Позиция 511 относится к числу ранее аннотированных сайтов гликозилирования HN hPIV1, поэтому её потеря у части штаммов может отражать локальную изменчивость поверхностного гликопротеина. В то же время ключевой остаток N173, связанный в литературе с маскированием второго рецептор-связывающего участка hPIV1 [235], сохранялся у проанализированных штаммов. Выявленные замены в области 511–525, включая изменения, расположенные вблизи С-концевой части HN, требуют осторожной интерпретации, поскольку для них не описано экспериментально подтверждённого влияния на рецептор-связывающую активность, нейраминидазную активность или эффективность слияния. Области, охватывающие остатки 191–341 и 457–504, относятся к наиболее консервативным структурным доменам белка HN [236,237]. Сохранение предсказанных сайтов гликозилирования в пределах данных регионов может косвенно указывать на их потенциальную роль в поддержании структурной целостности белка и обеспечении его правильного сворачивания [237].

Для hPIV2 также были выявлены вариации в предсказанных паттернах гликозилирования. Примечательно, что предсказанный мотив гликозилирования в позиции 316 перекрывает ранее описанный антигенный участок белка HN [153]. Наличие или отсутствие мотива гликозилирования в этой позиции может влиять на структурную доступность данного антигенного региона и потенциально воздействовать на иммунное распознавание и антигенные свойства гликопротеина HN.

Для hPIV3 ряд исследований подчёркивает важность отдельных аминокислотных остатков белка HN для связывания с рецепторами и ферментативной активности. Участок I гликопротеина

HN участвует как в связывании с рецепторами, так и в нейраминидазной активности, тогда как второй участок связывания с рецептором связан с участком II [86,238]. Показано, что замены в позициях T193 и D216, связанных с участком I, могут существенно изменять каталитическую активность белка [86,238]. Кроме того, остатки R192, R424 и R502 формируют структурно важную полость в белке HN, и мутации в этих позициях могут влиять на антигенные свойства вируса [239]. К другим функционально значимым остаткам относятся H552 и Q559, расположенные в участке димеризации белка HN вблизи вторичного активного центра. Замена H552Q ассоциирована с повышением аффинности связывания с рецепторами, усиленной активацией белка слияния (F) и повышенной эффективностью мембранного слияния, тогда как замена Q559R может приводить к дестабилизации димера HN вследствие конформационных изменений на интерфейсе, потенциально нарушая структурную целостность комплекса HN–F [240–242]. Важно отметить, что ни одна из указанных замен не была обнаружена среди российских штаммов, проанализированных в настоящем исследовании. Хотя было выявлено ряд аминокислотных замен, характерных для недавно описанного кластера D, включая несколько замен в области стебля и глобулярной головки белка, ни одна из них не затрагивала известные функционально значимые остатки белка HN.

Анализ предсказанных мотивов N-связанного гликозилирования также показал, что паттерн гликозилирования прототипного штамма Washington/1957 C243 в целом сохраняется у российских изолятов. Исключение составили штаммы недавно выявленного кластера D, у которых отсутствовал предсказанный сайт гликозилирования в позиции 523, а также отдельные штаммы с вариациями в позициях 351 и 485. Ранее в экспериментальных исследованиях было показано, что изменения сайтов гликозилирования белка HN hPIV3 способны модифицировать взаимодействие вируса с рецепторами и эффективность взаимодействия белков HN и F [243]. Однако выявленные в настоящем исследовании различия основаны исключительно на биоинформатическом прогнозировании и их функциональное значение в настоящее время остаётся неизвестным.

Для hPIV4 молекулярная характеристика белка HN выявила консервативные подтип-специфические различия в предсказанных мотивах N-связанного гликозилирования. Штаммы hPIV4a обладают шестью предсказанными сайтами гликозилирования, включая мотив в позиции 433, который отсутствует у hPIV4b. Это различие может способствовать структурным или антигенным отличиям между подтипами. Все российские изоляты содержали полный набор

предсказанных сайтов гликозилирования hPIV4a, за исключением одного штамма, у которого отсутствовал мотив в позиции 279 вследствие нарушения консенсусной последовательности N-X-S/T. Поскольку гликозилирование может экранировать поверхностные белки вируса от нейтрализующих антител и влиять на аффинность связывания с рецепторами, потеря консервативного гликана требует дальнейшего изучения [17,244].

Недавние структурные исследования белка HN hPIV4 выявили консервативные каталитические остатки, участвующие в нейраминидазной активности (R175, D199, E402, R417, R507, Y535 и E556), которые локализованы в глобулярном домене головки белка [93]. Важно отметить, что ни один из предсказанных сайтов гликозилирования, выявленных в настоящем исследовании, не перекрывается с этими каталитическими остатками. Таким образом, подтип-специфические различия в гликозилировании, включая отсутствие сайта 433 у hPIV4b и потерю мотива 279 у одного российского изолята, вероятно, не оказывают прямого влияния на ферментативный активный центр, но могут воздействовать на локальную конформацию поверхности белка или доступность антигенных детерминант в области головки HN.

В целом, полученные результаты показывают, что, несмотря на наличие аминокислотных замен и различий в гликозилировании, связанных с отдельными генетическими линиями, ключевые функциональные участки белка HN остаются высоко консервативными, что отражает действие сильных структурных ограничений на этот многофункциональный вирусный гликопротеин.

Рекомбинация наряду с накоплением точечных мутаций рассматривается как один из механизмов, способствующих генетической изменчивости и эволюции РНК-вирусов [4]. Несмотря на то что события рекомбинации значительно чаще описываются у РНК-вирусов с геномом положительной полярности, они также были зарегистрированы у некоторых РНК-вирусов с геномом отрицательной полярности, включая представителей семейства Paramyxoviridae [245–247], таких как hPIV [17–19].

В предыдущих исследованиях рекомбинационные события для hPIV выявлялись лишь эпизодически. Bosc и соавт. не обнаружили признаков рекомбинации среди полногеномных последовательностей hPIV1, однако сообщили о нескольких потенциальных рекомбинантных вариантах hPIV3, интерпретация которых требовала осторожности вследствие возможного

смешанного характера исходных образцов [19]. Shao и соавт. также не выявили рекомбинации среди новых последовательностей hPIV1, hPIV2 и hPIV4, но описали потенциальное рекомбинационное событие у hPIV3 с предполагаемыми точками разрыва в области гена HN [17]. В свою очередь, Zhu и соавт. идентифицировали единственный потенциальный рекомбинантный штамм hPIV1, относящийся к кладе В, у которого предполагаемый участок рекомбинации локализовался в области гена F, при этом признаков рекомбинации среди hPIV2, hPIV3 и hPIV4 выявлено не было [18].

В настоящем исследовании потенциальные события рекомбинации были выявлены у одного штамма hPIV2 и двух штаммов hPIV3, тогда как для hPIV1 и hPIV4 подобных событий обнаружено не было. Примечательно, что оба рекомбинантных штамма hPIV3 относились к впервые охарактеризованному кластеру D, а предполагаемые участки рекомбинации затрагивали область гена HN, что согласуется с отдельными ранее опубликованными наблюдениями. При этом, несмотря на наличие рекомбинационных сигналов, данные штаммы сохраняли своё положение внутри кластера D и не изменяли общую топологию полногеномных филогенетических деревьев. Аналогичным образом рекомбинантный штамм hPIV2 сохранял свою принадлежность к подкластеру A2, несмотря на признаки рекомбинации с участием вирусов из различных филогенетических групп. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что выявленные события рекомбинации не оказывали существенного влияния на общую филогенетическую классификацию соответствующих штаммов.

Полученные результаты позволяют предположить, что рекомбинация не является ведущим механизмом формирования популяционной структуры hPIV1–4 и, вероятно, играет ограниченную роль в эволюции данных вирусов. Вместе с тем выявление подобных событий подчёркивает дополнительные возможности полногеномного секвенирования по сравнению с анализом отдельных генов. В отличие от исследований, основанных исключительно на последовательностях HN, полногеномный подход позволяет обнаруживать редкие эволюционные события в различных участках вирусного генома, тем самым обеспечивая более полное понимание молекулярной эволюции и генетического разнообразия вирусов парагриппа человека.

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 существующие представления о генетическом разнообразии данных вирусов и впервые охарактеризовать их популяционную структуру в России на примере Санкт-Петербурга в глобальном филогенетическом контексте. Были выделены и охарактеризованы современные изоляты hPIV 1-4 типов, получены штаммоспецифические сыворотки, а типовые штаммы четырех типов депонированы в Государственную коллекцию вирусов. Разработанные и валидированные панели праймеров для полногеномной амплификации hPIV1–3, защищённые патентами, продемонстрировали высокую эффективность при работе непосредственно с клиническим материалом и создали практическую основу для внедрения геномного мониторинга вирусов парагриппа человека. Применение альтернативного подхода SMART-9N обеспечило получение полных геномов hPIV4 и позволило включить данный тип в общий сравнительный анализ. Проведённый полногеномный филогенетический анализ показал, что штаммы hPIV, циркулирующие в Санкт-Петербурге, относятся к глобально распространённым филогенетическим группам и характеризуются значительным внутритипным разнообразием. Особую значимость имеет впервые охарактеризованная в настоящем исследовании филогенетическая группа hPIV3, обозначенная как кластер D, что подчёркивает высокую разрешающую способность полногеномного подхода и его значение для выявления новых генетических вариантов вирусов. Дополнительный анализ гена HN, аминокислотных замен и потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования подтвердил общую согласованность молекулярных и филогенетических данных и показал, что при наличии групп-специфичных аминокислотных вариаций ключевые функционально значимые области белка HN сохраняют высокую степень консервативности. Анализ полных геномов также позволил выявить отдельные потенциальные события рекомбинации, подчёркивая дополнительные возможности полногеномного секвенирования для изучения эволюции hPIV по сравнению с исследованиями, основанными на анализе отдельных генов.

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

Перспективы дальнейших исследований

Несмотря на значительное расширение объёма геномных данных, достигнутое в настоящем исследовании, продолжение молекулярного надзора за вирусами парагриппа человека остаётся необходимым для понимания их эволюционной динамики. Разработанные в данной работе панели праймеров для hPIV1–3, а также метагеномный подход к секвенированию, применённый для hPIV4, представляют собой практические инструменты, которые могут быть интегрированы в программы рутинного геномного мониторинга респираторных вирусов. Применение этих подходов к более обширным и географически разнообразным наборам данных позволит обеспечить более полный мониторинг генетического разнообразия вирусов и может способствовать раннему выявлению новых генетических вариантов.

Дальнейшие исследования, объединяющие геномные данные с детальной эпидемиологической и клинической информацией, позволят глубже понять взаимосвязь между генетическим разнообразием вирусов, особенностями их распространения и тяжестью вызываемого заболевания. Кроме того, полученные в данной работе типовые вирусные изоляты могут быть использованы в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение функциональных последствий генетической вариабельности, включая аминокислотные замены, затрагивающие поверхностные гликопротеины вируса, а также возможные изменения инфекционности и антигенных свойств вирусов.

В целом полученные в настоящем исследовании геномные данные, разработанные методические подходы и сформированная коллекция вирусных изолятов создают основу для дальнейшего изучения вирусов парагриппа человека и способствуют укреплению молекулярного надзора за респираторными патогенами как в России, так и в мировом масштабе.

ВЫВОДЫ

1. Сформирована коллекция современных изолятов вирусов парагриппа человека, относящихся ко всем четырём типам. Типовые изоляты четырех типов депонированы в Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.
2. Панели праймеров для полногеномной амплификации вирусов парагриппа человека типов hPIV1, hPIV2 и hPIV3 обеспечивают получение практически полных геномных последовательностей вируса непосредственно из клинического материала.
3. Получены и депонированы в международную базу данных GenBank 453 полногеномные последовательности вирусов парагриппа человека (105 hPIV1, 37 hPIV2, 303 hPIV3 и 8 hPIV4).
4. Вирусы парагриппа человека типов hPIV1–4, циркулирующие в Санкт-Петербурге, относятся к глобально распространённым филогенетическим группам и характеризуются значительным внутритиповым генетическим разнообразием. Для hPIV3 впервые выявлен, охарактеризован и обоснован как отдельная генетическая группа, кластер D, ранее идентифицированный в контексте глобальной филогенетической структуры.
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, P 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BPiV3 — вирус парагриппа крупного рогатого скота

Ct — значение порогового цикла (cycle threshold)

F — белок слияния

GIHSN — Глобальная сеть госпитального надзора за гриппом (Global Influenza Hospital Surveillance Network)

hAdV — аденовирус человека

hBoV — бокавирус человека

hCoV — сезонный коронавирус человека

hMPV — метапневмовирус человека

HN — гемагглютинин-нейраминидаза

hPIV — вирус парагриппа человека

hRSV — респираторно-синцитиальный вирус человека

hRV — риновирус человека

ICTV — Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses)

Inf A — вирус гриппа А

Inf B — вирус гриппа В

L — большой белок РНК-зависимой РНК-полимеразы

M — матричный белок

NDV — вирус болезни Ньюкасла птиц

NGS — секвенирование нового поколения

NP — нуклеокапсидный белок

P — фосфопротеин белок

SARS-CoV-2 — коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SeV — вирус Сендай

SISPA — независимая от последовательности амплификация с использованием одного праймера (Sequence-Independent Single-Primer Amplification)

SMART — переключение матрицы на 5'-конце РНК (Switching Mechanism at the 5' end of RNA Template)

SV5 — вирус обезьян 5

SV41 — вирус обезьян 41

TCID₅₀ — 50% инфекционная доза для культуры клеток (50% tissue culture infectious dose)

WGS — полногеномное секвенирование

ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции

ОРС — открытые рамки считывания

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РГА — реакция гемагглютинации

РНК — рибонуклеиновая кислота

РТГА — реакция торможения гемагглютинации

ЦПД — цитопатическое действие

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J. Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and **2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012, 380, 2095–2128.**
2. Соминина, А.А.; Даниленко, Д.М. Комиссаров, А.Б.; Фадеев, А.В.; Писарева, М.М.; Еропкин, М.Ю.; Коновалова, Н.И.; Петрова, П.А.; Штро, А.А.; Столяров, К.А.; Карпова, Л.С.; et al. Результаты молекулярной детекции и характеристика вирусов гриппа и других возбудителей респираторных инфекций в России, сезон 2017–2018 гг. *Инфекция и иммунитет* **2018**, 8, 473–488, doi:10.15789/2220-7619-2018-4-473-488.
3. Бурцева, Е.И.; Бреслав, Н.В.; Мукашева, Е.А.; Краснослободцев, К.Г.; Кириллова, Е.С.; Трушакова, С.В.; Комарова, И.А.; Феодоритова, Е.Л.; Панова, А.Д.; Кистенева, Л.Б.; et al. Эпидемический Сезон 2023–2024 Гг.: Палитра Возбудителей ОРВИ На Некоторых Территориях РФ и в Регионах ВОЗ. *Probl. Virol.* **2025**, 70, 234–245, doi:10.36233/0507-4088-302.
4. Henrickson, K. Parainfluenza Viruses. *Clin Microbiol Rev* **2003**, 16, 242–264, doi:10.1128/CMR.16.2.242-264.2003.
5. Островская, О.В.; Холодок, Г.Н.; Ивахнишина, Н.М.; Морозова, Н.В.; Резник, В.И.; Савосина, Л.В.; Лебедева, Л.А.; Присяжнюк, Е.Н. спектр возбудителей острых респираторных вирусных инфекций, выявленных у детей с внебольничными пневмониями в эпидемический сезон 2013–2014 гг. *Инфекционные болезни, иммунология, иммунотерапия* **2014**, 45–48.
6. Яцышина, С.Б.; Спичак, Т.В.; Ким, С.С.; Воробьева, Д.А.; Агеева, М.Р.; Горелов, А.В.; Учайкин, В.Ф.; Покровский, В.И. выявление респираторных вирусов и атипичных бактерий у больных пневмонией и здоровых детей за десятилетний период наблюдения. **2016**, 6, 78–84.
7. Писарева, М.М.; Едер, В.А.; Бузицкая, Ж.В.; Мусаева, Т.Д.; Афанасьева, В.С.; Го, А.А.; Образцова, Е.А.; Суховецкая, В.Ф. Комиссаров, А.Б. Этиологическая Структура

- Гриппа и Других ОРВИ в Санкт-Петербурге в Эпидемические Сезоны 2012-2016 Гг. *Вопросы вирусологии* **2018**, 63, 233–239, doi:10.18821/0507-4088-2018-63-5-233-239.
8. Львов, Н.И.; Писарева, М.М.; Мальцев, О.В.; Бузицкая, Ж.В.; Афанасьева, В.С.; Михайлова, М.А.; Го, А.; Янина, М.А.; Резниченко, Н.А.; Грудинин, М.П.; et al. Особенности Этиологической Структуры ОРВИ в Отдельных Возрастных и Профессиональных Группках Населения Санкт-Петербурга в Эпидемический Сезон 2013-2014 Гг. *Журнал инфектологии* **2014**, 6, 62–70, doi:10.22625/2072-6732-2014-6-3-62-70.
 9. Жигарловский, Б.А. Салтыкова, Т.С.; Брико, Н.И.; Герасимов, А.Н.; Иваненко, А.В.; Волкова, Н.А.; Лиознов, Д.А.; Даниленко, Д.. Особенности Эпидемического Процесса Острых Респираторных Инфекций, Вызванных Разными Этиологическими Агентами. *Эпидемиол. инфекц. болезни. Актуал. вопр* **2020**, 10, 45–51, doi:10.18565/epidem.2020.10.4.45–51.
 10. Hall, C. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1917–1928.
 11. Karron, R.A.; Collins, P.L. Parainfluenza Viruses. In *Fields Virology 6th ed*; Lippincott Williams & Wilkins, **2013**; pp. 669–1023 ISBN 9781119650836.
 12. Porotto, M.; Murrell, M.; Greengard, O.; Doctor, L.; Moscona, A. Influence of the Human Parainfluenza Virus 3 Attachment Protein's Neuraminidase Activity on Its Capacity To Activate the Fusion Protein. *J. Virol.* **2005**, 79, 2383–2392, doi:10.1128/jvi.79.4.2383-2392.2005.
 13. Palermo, L.M.; Porotto, M.; Yokoyama, C.C.; Palmer, S.G.; Mungall, B.A.; Greengard, O.; Niewiesk, S.; Moscona, A. Human Parainfluenza Virus Infection of the Airway Epithelium: Viral Hemagglutinin-Neuraminidase Regulates Fusion Protein Activation and Modulates Infectivity. *J. Virol.* **2009**, 83, 6900–6908, doi:10.1128/jvi.00475-09.
 14. Schmidt, A.C.; Schaap-Nutt, A.; Bartlett, E.J.; Schomacker, H.; Boonyaratanakornkit, J.; Karron, R.A.; Collins, P.L. Progress in the Development of Human Parainfluenza Virus Vaccines. *Expert Rev. Respir. Med.* **2011**, 5, 515–526, doi:10.1586/ers.11.32.

15. Almajhdi, F.N.; Alshaman, M.S.; Amer, H.M. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Human Parainfluenza Virus Type 3 Isolated from Saudi Arabia. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1304–1311.
16. Mao, N.; Ji, Y.; Xie, Z.; Wang, H.; Wang, H.; An, J.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Zhu, Z.; Cui, A.; et al. Human Parainfluenza Virus-Associated Respiratory Tract Infection among Children and Genetic Analysis of HPIV-3 Strains in Beijing, China. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0043893.
17. Shao, N.; Liu, B.; Xiao, Y.; Wang, X.; Ren, L.; Dong, J.; Sun, L.; Zhu, Y.; Zhang, T.; Yang, F. Genetic Characteristics of Human Parainfluenza Virus Types 1 – 4 From Patients With Clinical Respiratory Tract Infection in China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fmicb.2021.679246.
18. Zhu, Y.; Sun, Y.; Li, C.; Lu, G.; Jin, R.; Xu, B.; Shang, Y.; Ai, J.; Wang, R.; Duan, Y. Genetic Characteristics of Human Parainfluenza Viruses 1–4 Associated with Acute Lower Respiratory Tract Infection in Chinese Children, during 2015–2021. *Microbiol. Spectr.* **2024**, *12*, e0343223, doi:10.1128/spectrum.03432-23.
19. Bose, M.E.; Shrivastava, S.; He, J.; Nelson, M.I.; Bera, J.; Fedorova, N.; Halpin, R.; Town, C.D.; Lorenzi, H.A.; Amedeo, P.; et al. Sequencing and Analysis of Globally Obtained Human Parainfluenza Viruses 1 and 3 Genomes. *PLoS One* **2019**, *14*, e0220057, doi:10.1371/journal.pone.0220057.
20. Bisi, E.; Boschi, C.; Hikmat, H.; Delerce, J.; Le Targa, L.; Lesage, L.; Morand, A.; La Scola, B.; Colson, P. Characterization of Human Parainfluenza Virus Type 2 Circulating in Southern France between 2017 and 2022 Using Whole-Genome Sequencing. *Virus Genes* **2026**, *62*, 80–91, doi:10.1007/s11262-025-02207-6.
21. Smielewska, A.; Emmott, E.; Ranellou, K.; Popay, A.; Goodfellow, I.; Jalal, H. UK Circulating Strains of Human Parainfluenza 3: An Amplicon Based next Generation Sequencing Method and Phylogenetic Analysis. *Wellcome open Res.* **2018**, *3*, 118, doi:10.12688/wellcomeopenres.14730.2.
22. Lamb, R.; Parks, G. Paramyxoviridae. In *Fields Virology 6th ed*; Lippincott Williams &

- Wilkins, **2013**; pp. 957–995 ISBN 9781451105636.
23. Chanock, R. Association of a New Type of Cytopathogenic Myxovirus with Infantile Croup **1956**, 555–576.
 24. Chanock, R.; Roizman, B.; Myers, R. Recovery From Infants With Respiratory Illness of a Virus Related To Chimpanzee Coryza Agent (Cca). *Am. J. Epidemiol.* **1957**, *66*, 281–290.
 25. Chanock, R.; Parrott, R.; Cook, K.; Anderews, B.; Bell, J.; Reichelderfer, T. Newly Recognized Myxoviruses from Children with Respiratory Disease **1958**, 207–213.
 26. Johnson, K.; Chanock, R.; Cook, M. k; Huebner, R.J. Studies of a New Human Hemadsorption Virus. I. Isolation, Properties and Characterization. *Am J Hyg* **1960**, *71*, 81–92, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120092.
 27. Gardner, P.; McQuillin, J.; McGuckin, R.; Ditchburn, R. Observations on Clinical and Immunofluorescent Diagnosis of Parainfluenza Virus Infections. *Br Med J* **1971**, *2*, 7–12, doi:10.1136/bmj.2.5752.7.
 28. Downham, M.A.P.S.; Mcquillin, J.; Gardner, P.S.; Archives, P.S. Diagnosis and Clinical Significance of Parainfluenza Virus Infections in Children. *Arch. Dis. Child.* **1974**, *49*, 8–15, doi:10.1136/adc.49.1.8.
 29. Frank, A.L.; Couch, R.B.; Griffis, C.A.; Baxter, B.D. Comparison of Different Tissue Cultures for Isolation and Quantitation of Influenza and Parainfluenza Viruses. *J. Clin. Microbiol.* **1979**, *10*, 32–36, doi:10.1128/jcm.10.1.32-36.1979.
 30. Almajhdi, F.N. Hemagglutinin-Neuraminidase Gene Sequence-Based Reclassification of Human Parainfluenza Virus 3 Variants. *Intervirology* **2015**, *58*, 35–40, doi:10.1159/000369208.
 31. Linster, M.; Anh, L.; Do, H.; Ngoc, N.; Minh, Q.; Chen, Y.; Zhe, Z.; Anh, T.; Tuan, H.M.; Su, Y.C.F.; et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Human Parainfluenza Viruses 1 – 4 in Children from Viet Nam. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6833, doi:10.1038/s41598-018-24767-4.
 32. Goya, S.; Mistchenko, A.; Viegas, M. Phylogenetic and Molecular Analyses of Human Parainfluenza Type 3 Virus in Buenos Aires, Argentina, between 2009 and 2013: The

- Emergence of New Genetic Lineages. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *39*, 85–91, doi:10.1016/j.meegid.2016.01.002.
33. Aso, J.; Kimura, H.; Ishii, H.; Saraya, T.; Kurai, D.; Nagasawa, K.; Matsushima, Y.; Ryo, A.; Takizawa, H. Molecular Evolution of the Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) Gene in Human Respirovirus 3. *Virus Res.* **2020**, *277*, 197824, doi:10.1016/j.virusres.2019.197824.
 34. Rima, B.; Balkema-Buschmann, A.; Dundon, W.G.; Duprex, P.; Easton, A.; Fouchier, R.; Kurath, G.; Lamb, R.; Lee, B.; Rota, P.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1593–1594, doi:10.1099/jgv.0.001328.
 35. Canchola, J.; Vargosko, A.; Kim, H.; Parrott, R.; Christmas, E.; Jeffries, B.; Chanock, R. ANTIGENIC VARIATION AMONG NEWLY ISOLATED STRAINS OF PARAINFLUENZA TYPE 4 VIRUS. *Am J Hyg* **1964**, *79*, 357–364, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120390.
 36. Xiao, N.; Duan, Z.; Xie, Z.; Zhong, L.; Zeng, S.; Huang, H.; Gao, H.; Zhang, B. Human Parainfluenza Virus Types 1-4 in Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Infections in China. *J Med Virol* **2016**, *88*, 2085–2091, doi:10.1002/jmv.24580.
 37. Wolf, Y.; Kazlauskas, D.; Iranzo, J.; Lucía-Sanz, A.; Kuhn, J.; Krupovic, M.; Dolja, V.; Koonin, E. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *MBio* **2018**, *9*, e02329-18, doi:10.1128/mBio.02329-18.
 38. Dolja, V. V; Koonin, E. V Metagenomics Reshapes the Concepts of RNA Virus Evolution by Revealing Extensive Horizontal Virus Transfer. *Virus Res.* **2018**, *244*, 36–52, doi:10.1016/j.virusres.2017.10.020.
 39. Simmonds, P.; Adams, M.; Benkő, M.; Breitbart, M.; Brister, J.; Carstens, E.; Davison, A.; Delwart, E.; Gorbalenya, A.; Harrach, B.; et al. Consensus Statement: Virus Taxonomy in the Age of Metagenomics. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15*, 161–168, doi:10.1038/nrmicro.2016.177.
 40. Thibault, P.; Watkinson, R.; Moreira-Soto, A.; Drexler, J.; Lee, B. Zoonotic Potential of Emerging Paramyxoviruses: Knowns and Unknowns. *Adv. Virus Res.* **2017**, *98*, 1–55,

doi:10.1016/bs.aivir.2016.12.001.

41. Rima, B.; Collins, P.; Easton, A.; Fouchier, R.; Kurath, G.; Lamb, R.; Lee, B.; Maisner, A.; Rota, P.; Wang, L. Problems of Classification in the Family Paramyxoviridae. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1395–1404, doi:10.1007/s00705-018-3720-2.
42. Ludwig, K.; Schade, B.; Bo'ttcher, C.; Korte, T.; Ohlwein, N.; Baljinnyam, B.; Veit, M.; Herrmann, A. Electron Cryomicroscopy Reveals Different F1+F2 Protein States in Intact Parainfluenza Virions. *J Virol* **2008**, *82*, 3775–3781.
43. Gui, L.; Jurgens, E.M.; Ebner, c J.L.; Porotto, M.; Moscona, A.; Lee, K.K. Electron Tomography Imaging of Surface Glycoproteins on Human Parainfluenza Virus 3: Association of Receptor Binding and Fusion Proteins before Receptor Engagement. *MBio* **2015**, *6*, e02393-14.
44. Loney, C.; Mottet-Osman, G.; Roux, L.; Bhella, D. Paramyxovirus Ultrastructure and Genome Packaging: Cryo-Electron Tomography of Sendai Virus. *J Virol* **2009**, *83*, 8191–8197.
45. Moscona, A. Entry of Parainfluenza Virus into Cells as a Target for Interrupting Childhood Respiratory Disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1688–1698, doi:10.1172/JCI25669.
46. Morrison, T.G. Structure and Function of a Paramyxovirus Fusion Protein. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1614*, 73–84, doi:10.1016/S0005-2736(03)00164-0.
47. Zhang, G.; Zhong, Y.; Qin, Y.; Chen, M. Interaction of Human Parainfluenza Virus Type 3 Nucleoprotein with Matrix Protein Mediates Internal Viral Protein Assembly. *J Virol* **2015**, *90*, 2306–2315.
48. Giuffre, R.; Tovell, D.; Kay, C.; Tyrrell, D. Evidence for an Interaction between the Membrane Protein of a Paramyxovirus and Actin. *J Virol* **1982**, *42*, 963–968.
49. Galinski, M. Annotated Nucleotide and Protein Sequences for Selected Paramyxoviridae. *The paramyxoviruses* **1991**, 537–568.
50. Galinski, M.; Mink, M.; Pons, M. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Human Parainfluenza 3 Virus Gene Encoding the L Protein. *Virology* **1988**, *165*, 499–510.

51. Dimock, K.; Rud, E.; Kang, C. 3'-Terminal Sequence of Human Parainfluenza Virus 3 Genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 4694.
52. Shioda, T.; Hidaka, Y.; Kanda, T.; Shibuta, H.; Nomoto, A.; Iwasaki, K. Sequence of 3,687 Nucleotides from the 3' End of Sendai Virus Genome RNA and the Predicted Amino Acid Sequences of Viral NP, P and C Proteins. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 7317–7330.
53. Yusoff, K.; Millar, N.; Chambers, P.; Emmerson, P. Nucleotide Sequence Analysis of the L Gene of Newcastle Disease Virus: Homologies with Sendai and Vesicular Stomatitis Viruses. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 3961–3976.
54. Sánchez, A.; Banerjee, A.; Furuichi, Y.; Richardson, M. Conserved Structures among the Nucleocapsid Proteins of the Paramyxoviridae: Complete Nucleotide Sequence of Human Parainfluenza Virus Type 3 NP mRNA. *Virology* **1986**, *152*, 171–180.
55. Bloyet, L. The Nucleocapsid of Paramyxoviruses: Structure and Function of an Encapsidated Template. *Viruses* **2021**, *13*, 2465, doi:10.3390/v13122465.
56. Horvath, C. Silencing STATs: Lessons from Paramyxovirus Interferon Evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* **2004**, *15*, 117–127.
57. Cattaneo, R.; Kaelin, K.; Baczko, K.; Billeter, M. Measles Virus Editing Provides an Additional Cysteine-Rich Protein. *Cell* **1989**, *56*, 759–764.
58. Lamb, R.; Paterson, R. The Nonstructural Proteins of Paramyxoviruses. In *The Paramyxoviruses*; Springer, Boston, MA, **1991**; pp. 181–214 ISBN 978-1-4613-6689-8.
59. Bracken, M.; Hayes, B.; Kandel, S.; Scott-Shemon, D.; Ackerson, L.; Hoffman, M. Viral Protein Requirements for Assembly and Release of Human Parainfluenza Virus Type 3 Virus-like Particles. *J Gen Virol* **2016**, *97*, 1305–1310.
60. Battisti, A.; Meng, G.; Winkler, D. Structure and Assembly of a Paramyxovirus Matrix Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 13996–14000.
61. Vainionpää, R.; Hyypiä, T. Biology of Parainfluenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 265–275, doi:10.1128/CMR.7.2.265.

62. Nishio, M.; Tsurudome, M.; Ito, M.; Kawano, M.; Kusagawa, S.; Komada, H.; Ito, Y. Mapping of Domains on the Human Parainfluenza Virus Type 2 Nucleocapsid Protein (NP) Required for NP-Phosphoprotein or NP-NP Interaction. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 2017–2022, doi:10.1099/0022-1317-80-8-2017.
63. Myers, T.; Pieters, A.; Moyer, S. A Highly Conserved Region of the Sendai Virus Nucleocapsid Protein Contributes to the NP-NP Binding Domain. *Virology* **1997**, *229*, 322–335.
64. Fooks, A.; Stephenson, J.; Warnes, A.; Dowsett, A.; Rima, B.; Wilkinson, G. Measles Virus Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells Assembles into Nucleocapsid-like Structures. *J. Gen. Virol.* **1993**, *74*, 1439–1444, doi:10.1099/0022-1317-74-7-1439.
65. Finch, J.; Gibbs, A. Observations on the Structure of the Nucleocapsids of Some Paramyxoviruses. *J Gen Virol* **1970**, *6*, 141–150.
66. Compans, R.; Choppin, P. Isolation and Properties of the Helical Nucleocapsid of the Parainfluenza Virus SV5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**, *57*, 949–956.
67. Heggeness, M.; Scheid, A.; Choppin, P. Conformation of the Helical Nucleocapsids of Paramyxoviruses and Vesicular Stomatitis Virus: Reversible Coiling and Uncoiling Induced by Changes in Salt Concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 2631–2635, doi:10.1073/pnas.77.5.2631.
68. Gutsche, I.; Desfosses, A.; Effantin, G, et al Structural Virology. Near-Atomic Cryo-EM Structure of the Helical Measles Virus Nucleocapsid. *Science (80-.).* **2015**, *348*, 704–707.
69. Bhella, D.; Ralph, A.; Yeo, R.P. Conformational Flexibility in Recombinant Measles Virus Nucleocapsids Visualised by Cryo-Negative Stain Electron Microscopy and Real-Space Helical Reconstruction. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 319–331, doi:10.1016/j.jmb.2004.05.015.
70. Cox, R.; Pickar, A.; Qiu, S, et al Structural Studies on the Authentic Mumps Virus Nucleocapsid Showing Uncoiling by the Phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 15208–15213.
71. Pelet, T.; Curran, J.; Kolakofsky, D. The P Gene of Bovine Parainfluenza Virus 3 Expresses

- All Three Reading Frames from a Single mRNA Editing Site. *EMBO J.* **1991**, *10*, 443–448, doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07966.x.
72. Tarbouriech, N.; Curran, J.; Ruigrok, R.W.H.; Burmeister, W.P. Tetrameric Coiled Coil Domain of Sendai Virus Phosphoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 777–781, doi:10.1038/79013.
 73. Curran, J.; Marq, J.; Kolakofsky, D. An N-Terminal Domain of the Sendai Paramyxovirus P Protein Acts as a Chaperone for the NP Protein during the Nascent Chain Assembly Step of Genome Replication. *J Virol* **1995**, *69*, 849–855.
 74. Horikami, S.; Curran, J.; Kolakofsky, D.; Moyer, S. Complexes of Sendai Virus NP-P and P-L Proteins Are Required for Defective Interfering Particle Genome Replication in Vitro. *J Virol* **1992**, *66*, 4901–4908.
 75. Heggeness, M.; Smith, P.; Choppin, P. In Vitro Assembly of the Nonglycosylated Membrane Protein (M) of Sendai Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 6232–6236.
 76. Hewitt, J. Studies on the Subunit Composition of the M-Protein of Sendai Virus. *FEBS Lett* **1977**, *81*, 395–397.
 77. Galinski, M.; Mink, M.; Lambert, D.; Wechsler, S.; Pons, M. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Human Parainfluenza 3 Virus Gene Encoding the Matrix Protein. *Virology* **1987**, *157*, 24–30.
 78. Spriggs, M.K.; Johnson, P.R.; Collins, P.L. Sequence Analysis of the Matrix Protein Gene of Human Parainfluenza Virus Type 3: Extensive Sequence Homology among Paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* **1987**, *68*, 1491–1497, doi:10.1099/0022-1317-68-5-1491.
 79. Yin, H.S.; Paterson, R.G.; Wen, X.; Lamb, R.A.; Jardetzky, T.S. Structure of the Uncleaved Ectodomain of the Paramyxovirus (HPIV3) Fusion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9288–9293, doi:10.1073/pnas.0503989102.
 80. Toyoda, T.; Sakaguchi, T.; Imai, K.; Inocencio, N.M.; Gotoh, B.; Hamaguchi, M.; Nagai, Y. Structural Comparison of the Cleavage-Activation Site of the Fusion Glycoprotein between Virulent and Avirulent Strains of Newcastle Disease Virus. *Virology* **1987**, *158*,

- 242–247, doi:10.1016/0042-6822(87)90261-3.
81. Nagai, Y. Virus Activation by Host Proteinases. A Pivotal Role in the Spread of Infection, Tissue Tropism and Pathogenicity. *Microbiol Immunol* **1995**, *39*, 1–9, doi:10.1111/j.1348-0421.1995.tb02161.x.
 82. Coelingh, K.; Winter, C. Naturally Occurring Human Parainfluenza Type 3 Viruses Exhibit Divergence in Amino Acid Sequence of Their Fusion Protein Neutralization Epitopes and Cleavage Sites. *J Virol* **1990**, *64*, 1329–1334.
 83. Huberman, K.; Peluso, R.W.; Moscona, A. Hemagglutinin-Neuraminidase of Human Parainfluenza 3: Role of the Neuraminidase in the Viral Life Cycle. *Virology* **1995**, *214*, 294–300, doi:10.1006/viro.1995.9925.
 84. Suzuki, T.; Portner, A.; Scroggs, R.A.; Uchikawa, M.; Koyama, N.; Matsuo, K.; Suzuki, Y.; Takimoto, T. Receptor Specificities of Human Respiroviruses. *J. Virol.* **2001**, *75*, 4604–4613, doi:10.1128/jvi.75.10.4604-4613.2001.
 85. Lawrence, M.C.; Borg, N.A.; Streltsov, V.A.; Pilling, P.A.; Epa, V.C.; Varghese, J.N.; McKimm-Breschkin, J.L.; Colman, P.M. Structure of the Haemagglutinin-Neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type III. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1343–1357, doi:10.1016/j.jmb.2003.11.032.
 86. Porotto, M.; Fornabaio, M.; Kellogg, G.; Moscona, A. A Second Receptor Binding Site on Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase Contributes to Activation of the Fusion Mechanism. *J Virol* **2007**, *81*, 3216–3228.
 87. Moscona, A.; Peluso, R.W. Fusion Properties of Cells Persistently Infected with Human Parainfluenza Virus Type 3 : Participation of Hemagglutinin- Neuraminidase in Membrane Fusion. *J. Virol.* **1991**, *65*, 2773–2777.
 88. Merz, D.C.; Prehm, P.; Scheid, A.; Chopin, P.W. Inhibition of the Neuraminidase of Paramyxoviruses by Halide Ions: A Possible Means of Modulating the Two Activities of the HN Protein. *Virology* **1981**, *112*, 296–305, doi:10.1016/0042-6822(81)90635-8.
 89. Jiang, J.; Wen, H.; Chi, M.; Liu, Y.; Liu, J.; Cao, Z.; Zhao, L.; Song, Y.; Liu, N.; Chi, L.; et

- al. Functional Analysis of Amino Acids at Stalk/Head Interface of Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase Protein in the Membrane Fusion Process. *Virus Genes* **2018**, *54*, 333–342, doi:10.1007/s11262-018-1546-3.
90. Beck, E.T.; He, J.; Nelson, M.I.; Bose, M.E.; Fan, J.; Kumar, S.; Henrickson, K.J. Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of 39 Human Parainfluenza Virus Type 1 Strains Isolated from 1997 – 2010. *PLoS One* **2012**, *7*, e46048, doi:10.1371/journal.pone.0046048.
91. Feng, Y.; Zhu, Z.; Xu, J.; Sun, L.; Zhang, H.; Xu, H.; Zhang, F.; Wang, W.; Han, G.; Jiang, J.; et al. Molecular Evolution of Human Parainfluenza Virus Type 2 Based on Hemagglutinin-Neuraminidase Gene. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e0453722, doi:10.1128/spectrum.04537-22.
92. Coelingh, K.L.V.A.N.W.; Winter, C.C.; Jorgensen, E.D.; Murphy, B.R. Antigenic and Structural Properties of the Hemagglutinin- Neuraminidase Glycoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 3 : Sequence Analysis of Variants Selected with Monoclonal Antibodies Which Inhibit Infectivity , Hemagglutination , and Neuraminidase A. *J. Virol.* **1987**, *61*, 1473–1477, doi:10.1128/JVI.61.5.1473-1477.1987.
93. Otani, K.; Kimura, R.; Nagasawa, N.; Hayashi, Y.; Ohmiya, S.; Watanabe, O.; Khandaker, I.; Kimura, H.; Nishimura, H. Phylogenomic Analyses of the Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) Gene in Human Parainfluenza Virus Type 4 Isolates in Japan. *Microorganisms* **2025**, *13*, 384, doi:10.3390/microorganisms13020384.
94. Streltsov, V.A.; Pilling, P.; Barrett, S.; Mckimm-breschkin, J.L. Catalytic Mechanism and Novel Receptor Binding Sites of Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase (HPIV3 HN). *Antiviral Res.* **2015**, *123*, 216–223, doi:10.1016/j.antiviral.2015.08.014.
95. Mishin, V.P.; Watanabe, M.; Taylor, G.; Devincenzo, J.; Bose, M.; Portner, A.; Alymova, I. V N-Linked Glycan at Residue 523 of Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase Masks a Second Receptor-Binding Site. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3094–3100, doi:10.1128/JVI.02331-09.
96. Liang, B. Structures of the Mononegavirales Polymerases. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00175-20,

- doi:10.1128/JVI.00175-20.
97. Ogino, T.; Kobayashi, M.; Iwama, M.; Mizumoto, K. Sendai Virus RNA-Dependent RNA Polymerase L Protein Catalyzes Cap Methylation of Virus-Specific mRNA. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 4429–4435, doi:10.1074/jbc.M411167200.
 98. Poch, O.; Blumberg, B.; Bougueleret, L.; Tordo, N. Sequence Comparison of Five Polymerases (L Proteins) of Unsegmented Negative-Strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains. *J Gen Virol* **1990**, *71*, 1153–1162.
 99. Ogino, T.; Banerjee, A. Unconventional Mechanism of mRNA Capping by the RNA-Dependent RNA Polymerase of Vesicular Stomatitis Virus. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 85–97, doi:10.1016/j.molcel.2006.11.013.
 100. Jordan, P.; Liu, C.; Raynaud, P.; Lo, M.; Spiropoulou, C.; Symons, J.; Beigelman, L.; Deval, J. Initiation, Extension, and Termination of RNA Synthesis by a Paramyxovirus Polymerase. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006889, doi:10.1371/journal.ppat.1006889.
 101. Longhi, S.; Bloyet, L.; Gianni, S.; Gerlier, D. How Order and Disorder within Paramyxoviral Nucleoproteins and Phosphoproteins Orchestrate the Molecular Interplay of Transcription and Replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 3091–3118, doi:10.1007/s00018-017-2556-3.
 102. Rodriguez Galvan, J.; Donner, B.; Veseley, C.; Reardon, P.; Forsythe, H.; Howe, J.; Fujimura, G.; Barbar, E. Human Parainfluenza Virus 3 Phosphoprotein Is a Tetramer and Shares Structural and Interaction Features with Ebola Phosphoprotein VP35. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1603, doi:10.3390/biom11111603.
 103. Kingston, R.; Hamel, D.; Gay, L.; Dahlquist, F.; Matthews, B. Structural Basis for the Attachment of a Paramyxoviral Polymerase to Its Template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8301–8306, doi:10.1073/pnas.0402690101.
 104. Galinski, M.S. Paramyxoviridae: Transcription and Replication. *Adv. Virus Res.* **1991**, *39*, 129–162, doi:10.1016/S0065-3527(08)60794-0.
 105. Noton, S.; Fearn, R. Initiation and Regulation of Paramyxovirus Transcription and

- Replication. *Virology* **2015**, 479-480:545-554.
106. Fry, A.M.; Curns, A.T.; Harbour, K.; Hutwagner, L.; Holman, R.C.; Anderson, L.J. Seasonal Trends of Human Parainfluenza Viral Infections: United States, 1990-2004. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *43*, 1016–1022, doi:10.1086/507638.
 107. Schomacker, H.; Schaap-Nutt, A.; Collins, P.L.; Schmidt, A.C. Pathogenesis of Acute Respiratory Illness Caused by Human Parainfluenza Viruses. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 294–299, doi:10.1016/j.coviro.2012.02.001.
 108. Ansari, S.; Springthorpe, V.; Sattar, S.; Ivard, S.; Rahman, M. Potential Role of Hands in the Spread of Respiratory Viral Infections: Studies with Human Parainfluenza Virus 3 and Rhinovirus 14. *J Clin Microbiol* **1991**, *29*, 2115–2119, doi:10.1128/jcm.29.10.2115-2119.1991.
 109. Maykowski, P.; Smithgall, M.; Zachariah, P.; Oberhardt, M.; Vargas, C.; Reed, C.; Demmer, R.; Stockwell, M.; Saiman, L. Seasonality and Clinical Impact of Human Parainfluenza Viruses. *Influenza Other Respi. Viruses* **2018**, *12*, 706–716, doi:10.1111/irv.12597.
 110. Chellapuri, A.; Smitheman, M.; Chappell, J.; Clark, G.; Howson-wells, H.; Berry, L.; Ball, J.; Irving, W.; Tarr, A.; McClure, C. Human Parainfluenza 2 & 4: Clinical and Genetic Epidemiology in the UK, 2013-2017, Reveals Distinct Disease Features and Co-Circulating Genomic Subtypes. *Influ. Other Respir Viruses* **2022**, *16*, 1122–1132, doi:10.1111/irv.13012.
 111. Gao, Y.; Ma, Y.; Feng, D.; Zhang, F.; Wang, B.; Liu, X.; Zhu, B.; Xie, H. Epidemiological Characteristics of Human Parainfluenza Viruses Infections - China, 2019-2023. *China CDC Wkly* **2024**, *6*, 235–241, doi:10.46234/ccdcw2024.047.
 112. Vachon, M.; Dionne, N.; Leblanc, E.; Moisan, D.; Bergeron, M.; Boivin, G. Human Parainfluenza Type 4 Infections, Canada. *Emerg Infect Dis* **2006**, *12*, 1755–1758, doi:10.3201/eid1211.060196.
 113. Lau, S.K.P.; Li, K.S.M.; Chau, K.; So, L.; Lee, R.A.; Lau, Y.; Chan, K.; Lim, W.W.L.;

- Woo, P.C.Y.; Yuen, K. Clinical and Molecular Epidemiology of Human Parainfluenza Virus 4 Infections in Hong Kong : Subtype 4B as Common as Subtype 4A. *J Clin Microbiol* **2009**, *47*, 1549–1552, doi:10.1128/JCM.00047-09.
114. Weinberg, G.A.; Hall, C.B.; Iwane, M.K.; Poehling, K.A.; Edwards, K.M.; Griffin, M.R.; Staat, M.A.; Curns, A.T.; Erdman, D.D.; Szilagyi, P.G. Parainfluenza Virus Infection of Young Children: Estimates of the Population-Based Burden of Hospitalization. *J. Pediatr.* **2009**, *154*, 694–699, doi:10.1016/j.jpeds.2008.11.034.
115. Abedi, G.; Prill, M.; Langley, G.; Wikswa, M.; Weinberg, G.; Curns, A.; E, S. Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998-2010. *J Pediatr. Infect Dis Soc* **2018**, *5*, 7–13, doi:10.1093/jpids/piu047.
116. Reed, G.; Jewett, P.H.; Thompson, J.; Tollefson, S.; Wright, P.F. Epidemiology and Clinical Impact of Parainfluenza Virus Infections in Otherwise Healthy Infants and Young Children <5 Years Old. *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 807–813, doi:10.1086/513975.
117. Iwane, M.K.; Edwards, K.M.; Szilagyi, P.G.; Walker, F.J.; Griffin, M.R.; Weinberg, G.A.; Coulen, C.; Poehling, K.A.; Shone, L.P.; Balter, S.; et al. Population-Based Surveillance for Hospitalizations Associated with Respiratory Syncytial Virus, Influenza Virus, and Parainfluenza Viruses among Young Children. *Pediatrics* **2004**, *113*, 1758–1764, doi:10.1542/peds.113.6.1758.
118. Morgan, O.; Chittaganpitch, M.; Clague, B.; Chantra, S.; Sanasuttipun, W.; Prapasiri, P.; Naorat, S.; Laosirithavorn, Y.; Peret, T.; Erdman, D.; et al. Hospitalization Due to Human Parainfluenza Virus – Associated Lower Respiratory Tract Illness in Rural. *Influ. Other Respir Viruses* **2013**, *7*, 280–285, doi:10.1111/j.1750-2659.2012.00393.x.
119. Ramezannia, Z.; Sadeghi, J.; Abdoli Oskouie, S.; Ahangarzadeh Rezaee, M.; Bannazadeh Baghi, H.; Azadi, A.; Ahangar Oskouee, M. Evaluation of Human Respiratory Syncytial Virus and Human Parainfluenza Virus Type 3 among Hospitalized Children in Northwest of Iran. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2021**, *2021*, doi:10.1155/2021/2270307.
120. Zhao, H.; Harris, R.; Ellis, J.; Donati, M.; RG, P. Epidemiology of Parainfluenza Infection

- in England and Wales, 1998-2013: Any Evidence of Change? *Epidemiol Infect* **2017**, *145*, 1210–1220, doi:10.1017/S095026881600323X.
121. DeGroot, N.; Haynes, A.; Taylor, C.; Killerby, M.; Dahl, R.; Mustaqim, D.; Gerber, S.; Watson, J. Human Parainfluenza Virus Circulation, United States, 2011-2019. *J. Clin. Virol.* **2020**, *124*, 104261, doi:10.1016/j.jcv.2020.104261.
122. Liu, W.K.; Liu, Q.; Chen, D.H.; Liang, H.X.; Chen, X.K.; Huang, W.B.; Qin, S.; Yang, Z.F.; Zhou, R. Epidemiology and Clinical Presentation of the Four Human Parainfluenza Virus Types. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 13–28, doi:10.1186/1471-2334-13-28.
123. Han, J.; Suh, W.; Han, S. Seasonal Epidemiological and Clinical Characteristics of Pediatric Patients with Human Parainfluenza Virus Infection by Serotype : A Retrospective Study. *Virol. J.* **2022**, *19*, 141, doi:10.1186/s12985-022-01875-2.
124. Chen J, Deng S, X.X. et al 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. *Lancet Glob. Heal.* **2025**, *13*, e1425–e1435, doi:10.1016/S2214-109X(25)00188-3.
125. Park, G.; Lee, J.; Lee, S.; Kim, J.; Kang, J.; Choi, U. Seroprevalence of Human Parainfluenza Virus Types 1-4 Among Healthy Children Under 5 Years of Age in Korea. *Viral Immunol.* **2018**, *31*, 352–357, doi:10.1089/vim.2017.0154.
126. Zhu, Z.; Zhang, Y.; Mao, N. Human Parainfluenza Virus: An Important but Overlooked Respiratory Pathogen. *World J. Pediatr.* **2025**, *21*, 220–222, doi:10.1007/s12519-025-00888-5.
127. Glezen, W.; Frank, A.; Taber, L.; Kasel, J. Parainfluenza Virus Type 3: Seasonality and Risk of Infection and Reinfection in Young Children. *J Infect Dis* **1984**, *150*, 851–857, doi:10.1093/infdis/150.6.851.
128. Villaran, M. V.; García, J.; Gomez, J.; Arango, A.E.; Gonzales, M.; Chicaiza, W.; Alemán, W.; De Rivera, I.L.; Sanchez, F.; Aguayo, N.; et al. Human Parainfluenza Virus in Patients with Influenza-like Illness from Central and South America during 2006-2010. *Influenza*

- Other Respi. Viruses* **2014**, *8*, 217–227, doi:10.1111/irv.12211.
129. Glezen, W.; Greenberg, S.; Atmar, R.; Piedra, P.; Couch, R. Impact of Respiratory Virus Infections on Persons with Chronic Underlying Conditions. *JAMA* **2000**, *283*, 499–505, doi:10.1001/jama.283.4.499.
 130. Falsey, A. Current Management of Parainfluenza Pneumonitis in Immunocompromised Patients: A Review. *Infect Drug Resist* **2012**, *5*, 121–127, doi:10.2147/IDR.S25874.
 131. Branche, A.R.; Falsey, A.R. Parainfluenza Virus Infection. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *37*, 538–554, doi:10.1055/s-0036-1584798.
 132. Greiff, D.R.L.; Christopher, A.P.; Glass, K.; Moore, H.C. Epidemiology and Seasonality of Human Parainfluenza Serotypes 1-3 in Australian Children. *Influ. Other Respir Viruses* **2021**, *15*, 661–669, doi:10.1111/irv.12838.
 133. Wang, L.; Lu, S.; Guo, Y.; Liu, J.; Wu, P.; Yang, S. Epidemiology and Clinical Severity of the Serotypes of Human Parainfluenza Virus in Children with Acute Respiratory Infection. *Virol. J.* **2023**, *20*, 1–7, doi:10.1186/s12985-023-02214-9.
 134. Kim, Y.J.; Han, J.S.; Jeon, J.; Jang, S.H.; Wang, Q.; Kim, J.K. Long-Term Trends in Human Parainfluenza Virus Types 1, 2, and 3 Infection in Korea (2007 – 2024). *Pathogens* **2025**, *14*, 1–10, doi:10.3390/pathogens14111159.
 135. Aguilar, J.; Pérez-Breña, M.; García, M.; Cruz, N.; Erdman, D.; Echevarría, J. Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4 in Clinical Samples of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* **2000**, *38*, 1191–1195, doi:10.1128/JCM.38.3.1191-1195.2000.
 136. Templeton, K.; Bredius, R.; Claas, E.; Kroes, A.; Walther, F. Parainfluenza Virus 4 Detection in Infants. *Eur J Pediatr* **2005**, *164*, 528–529, doi:10.1007/s00431-005-1693-0.
 137. Fairchok, M.; Martin, E.; Kuypers, J.; Englund, J. A Prospective Study of Parainfluenza Virus Type 4 Infections in Children Attending Daycare. *Pediatr Infect Dis J* **2011**, *30*, 714–716, doi:10.1097/INF.0b013e3182113989.
 138. Ren, L.; Gonzalez, R.; Xie, Z.; Xiong, Z.; Liu, C.; Xiang, Z. Human Parainfluenza Virus

- Type 4 Infection in Chinese Children with Lower Respiratory Tract Infections: A Comparison Study. *J Clin Virol* **2011**, *51*, 209–212, doi:10.1016/j.jcv.2011.05.001.
139. Russell, E.; Yang, A.; Tardrew, S.; Ison, M.G. Parainfluenza Virus in Hospitalized Adults: A 7-Year Retrospective Study. *Clin Infect Dis* **2019**, *68*, 298–305, doi:10.1093/cid/ciy451.
140. Miall, F.; Rye, A.; Fraser, M.; Hunter, A.; Snowden, J. Human Parainfluenza Type 4 Infection: A Case Report Highlighting Pathogenicity and Difficulties in Rapid Diagnosis in the Post-Transplant Setting. *Bone Marrow Transpl.* **2002**, *29*, 541–542, doi:10.1038/sj.bmt.1703402.
141. Chiu, C.Y.; Rouskin, S.; Koshy, A.; Urisman, A.; Fischer, K.; Yagi, S.; Schnurr, D.; Eckburg, P.B.; Tompkins, L.S.; Blackburn, B.G.; et al. Microarray Detection of Human Parainfluenzavirus 4 Infection Associated with Respiratory Failure in an Immunocompetent Adult. *Clin Infect Dis* **2006**, *43*, 71–76, doi:10.1086/507896.
142. Lau, S.K.P.; To, W.K.; Tse, P.W.T.; Chan, A.K.H.; Woo, P.C.Y.; Tsoi, H.W.; Leung, A.F.Y.; Li, K.S.M.; Chan, P.K.S.; Lim, W.W.L.; et al. Human Parainfluenza Virus 4 Outbreak and the Role of Diagnostic Tests. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 4515–4521, doi:10.1128/JCM.43.9.4515-4521.2005.
143. Abiko, C.; Mizuta, K.; Aoki, Y.; Ikeda, T.; Itagaki, T.; Noda, M.; Kimura, H.; Ahiko, T. An Outbreak of Parainfluenza Virus Type 4 Infections among Children with Acute Respiratory Infections during the 2011-2012 Winter Season in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis* **2013**, *66*, 76–78, doi:10.7883/yoken.66.76.
144. Chen, X.; Wang, H.; Li, Q.; Qi, Y.; Li, F.; He, W.; Wang, Q.; Jin, F.; Guo, Y. A Fatal Case of Neonatal Viral Sepsis Caused by Human Parainfluenza Virus Type 3. *Virol. J.* **2023**, *20*, 248, doi:10.1186/s12985-023-02141-9.
145. Lucas, J.; Haas, E.; Masoumi, H.; Krous, H. Sudden Death in a Toddler with Laryngotracheitis Caused by Human Parainfluenza Virus-1. *Pediatr Dev Pathol* **2009**, *12*, 165–168, doi:10.2350/08-06-0485.1.
146. Klippmark, E.; Rydbeck, R.; Shibuta, H.; Norrby, E. Antigenic Variation of Human and

- Bovine Parainfluenza Virus Type 3 Strains. *J Gen Virol.* **1990**, *71*, 1577–1580, doi:10.1099/0022-1317-71-7-1577.
147. Precious, B.; Southern, J.A.; Randall, R.E. Sequence Analysis of the HN Gene of Parainfluenza Virus Type 2. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71*, 1163–1168, doi:10.1099/0022-1317-71-5-1163.
148. Li, Y., Liu, M., Liang, J., Ye, H., Lyu, M., Chen, D., Liang, L., Zhang, S., Zhang, K., An, S., Zhou, W., Wu, J., Zhu, X., & He, Z. Epidemiological and Molecular Characteristics of Human Parainfluenza Virus in Southern China during 2016–2020. *Viol. Sin.* **2025**, *40*, 157–165, doi:10.1016/j.virs.2025.03.004.
149. Mizuta, K.; Saitoh, M.; Kobayashi, M.; Tsukagoshi, H.; Aoki, Y.; Ikeda, T.; Abiko, C.; Katsushima, N.; Itagaki, T.; Noda, M.; et al. Detailed Genetic Analysis of Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein Gene in Human Parainfluenza Virus Type 1 Isolates from Patients with Acute Respiratory Infection between 2002 and 2009 in Yamagata Prefecture, Japan. *Viol. J.* **2011**, *8*, 533, doi:10.1186/1743-422X-8-533.
150. Almajhdi, F.N.; Alshaman, M.S.; Amer, H.M. Human Parainfluenza Virus Type 2 Hemagglutinin- Neuraminidase Gene : Sequence and Phylogenetic Analysis of the Saudi Strain Riyadh 105 / 2009. *Viol. J.* **2012**, *9*, 316, doi:10.1186/1743-422X-9-316.
151. Park, K.; Yang, M.; Lee, C.; Song, K. Genetic Analysis of Human Parainfluenza Viruses Circulating in Korea, 2006. *J Med Virol* **2014**, *86*, 1041–1047, doi:10.1002/jmv.23890.
152. Zhou, S.; Mao, N.; Zhang, Y.; Cui, A.; Zhu, Z.; Hu, R.; Xu, J.; Xu, W. Genetic Analysis of Human Parainfluenza Virus Type 4 Associated with Severe Acute Respiratory Infection in Children in Luohe City, Henan Province, China, during 2017-2018. *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 2585–2590, doi:10.1007/s00705-021-05154-3.
153. Terrier, O.; Cartet, G.; Ferraris, O.; Morfin, F.; Thouvenot, D. Characterization of Naturally Occurring Parainfluenza Virus Type 2 (HPIV-2) Variants. *J. Clin. Virol.* **2008**, *43*, 86–92, doi:10.1016/j.jcv.2008.05.007.
154. Šantak, M., Slović, A., Ljubin-Sternak, S., Mlinarić Galinović, G., & Forčić, D. Genetic

- Diversity Among Human Parainfluenza Virus Type 2 Isolated in Croatia Between 2011 and 2014. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 1733–1741, doi:10.1002/jmv.24532.
155. Komada, H., Bando, H., Ito, M., Ohta, H., Kawano, M., Nishio, M., Tsurudome, M., Watanabe, N., Ikemura, N., & Kusagawa, S. Sequence Analyses of Human Parainfluenza Virus Type 4A and Type 4B Fusion Proteins. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 3205–3210, doi:10.1099/0022-1317-76-12-3205.
156. Wang, X.; Braid, S.S.; Rawlinson, W.D. Detection of Respiratory Viruses Directly from Clinical Samples Using Next-Generation Sequencing: A Literature Review of Recent Advances and Potential for Routine Clinical Use. *Rev. Med. Virol.* **2022**, *32*, e2375, doi:10.1002/rmv.2375.
157. Li, C.; Zhang, X.; Liu, P.; Lu, M.; Xiao, L.; Ou, F.; Deng, H.; Zhang, W. Targeted Next-Generation Sequencing Characterization of Respiratory Pathogens in Children with Acute Respiratory Infection. *BMC Infect. Dis.* **2025**, *25*, 675, doi:10.1186/s12879-025-11051-w.
158. Brlek, P., Bulić, L., Bračić, M., Projić, P., Škaro, V., Shah, N., Shah, P., & Primorac, D. Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives. *Cells* **2024**, *13*, 504, doi:10.3390/cells13060504.
159. Phan, M.V.T.; Arron, G.; GeurtsvanKessel, C. H. Huisman, R.C.; Molenkamp, R.; Koopmans, M.P.G.; Cotten, M. Complete Genome Characterization of Eight Human Parainfluenza Viruses from the Netherlands. *Microbiol. Resour. Announc.* **2019**, *8*, e00125-19, doi:10.1128/MRA.00125-19.
160. Goya, S., & Greninger, A.L. Distinct Evolutionary Signatures of Human Parainfluenza Viruses 2 and 4 Reveal Host Antagonism Divergence and Phylogenetic Discordance. *Mol. Biol. Evol.* **2025**, *42*, msaf217, doi:10.1093/molbev/msaf217.
161. Mamanova, L.; Coffey, A.J.; Scott, C.E.; Kozarewa, I.; Turner, E.H.; Kumar, A.; Howard, E.; Shendure, J.; Turner, D.J. Target-Enrichment Strategies for next-Generation Sequencing. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 111–118, doi:10.1038/nmeth.1419.
162. Quick, J., Grubaugh, N. D., Pullan, S. T., Claro, I. M., Smith, A. D., Gangavarapu, K.,

- Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T. F., Beutler, N. A., Burton, D. R., Lewis-Ximenez, L. L., de Jesus, J. G., Giovanetti, M., Hill, S. C., Black, A., Bedford, N.J. Multiplex PCR Method for MinION and Illumina Sequencing of Zika and Other Virus Genomes Directly from Clinical Samples. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1261–1276, doi:10.1038/nprot.2017.066.
163. Tyson, J.R.; James, P.; Hall, G.; Smith, A.D.; Prystajecky, N.; Wilson, S.J.; Harrigan, R. Improvements to the ARTIC Multiplex PCR Method for SARS-CoV-2 Genome Sequencing Using Nanopore. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* **2020**, *2020.09.04*, 283077, doi:10.1101/2020.09.04.283077.
164. Itokawa, K.; Sekizuka, T.; Hashino, M.; Tanaka, R.; Kuroda, M. A Proposal of Alternative Primers for the ARTIC Network's Multiplex PCR to Improve Coverage of SARS-CoV-2 Genome Sequencing. *bioRxiv Prepr.* **2020**, doi:10.1101/2020.03.10.985150.
165. Tulloch, R.L.; Kok, J.; Carter, I.; Dwyer, D.E.; Eden, J.S. An Amplicon-Based Approach for the Whole-Genome Sequencing of Human Metapneumovirus. *Viruses* **2021**, *13*, 499, doi:10.3390/v13030499.
166. Vazquez-Pérez, J.A.; Martínez-Alvarado, E. Venancio-Landeros, A. A. Santiago-Olivares, C.; Mejía-Nepomuceno, F. Mendoza-Ramírez, E.; Rivera-Toledo, E. An Amplicon-Based Protocol for Whole-Genome Sequencing of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A. *Biol. methods Protoc.* **2024**, *9*, bpae007, doi:10.1093/biomethods/bpae007.
167. Ferrari, G.; Romano, G.; Pitrolo, A.M.G.; Baldanti, F.; Piralla, A. Development and Validation of Amplicon-Based Protocol for Sequencing of Respiratory Syncytial Virus Genome. *J. Med. Virol.* **2025**, *97*, e70571, doi:10.1002/jmv.70571.
168. Miller, R.R.; Montoya, V.; Gardy, J.L.; Patrick, D.M.; Tang, P. Metagenomics for Pathogen Detection in Public Health. *Genome Med.* **2013**, *5*, 81, doi:10.1186/gm485.
169. Gauthier, N.P.G.; Chorlton, S.D.; Kraiden, M.; Manges, A.R. Agnostic Sequencing for Detection of Viral Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2023**, *36*, e0011922, doi:10.1128/cmr.00119-22.

170. Allander, T.; Emerson, S.U.; Engle, R.E.; Purcell, R.H.; Bukh, J. A Virus Discovery Method Incorporating DNase Treatment and Its Application to the Identification of Two Bovine Parvovirus Species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11609–11614, doi:10.1073/pnas.211424698.
171. Djikeng, A.; Halpin, R.; Kuzmickas, R.; Depasse, J.; Feldblyum, J.; Sengamalay, N.; Afonso, C.; Zhang, X.; Anderson, N.G.; Ghedin, E.; et al. Viral Genome Sequencing by Random Priming Methods. *BMC Genomics* **2008**, *9*, doi:10.1186/1471-2164-9-5.
172. Zhu, Y.; Machleder, E.; Chenchik, A.; Li, R.; Siebert, P. Reverse Transcriptase Template Switching: A SMART™ Approach for Full-Length CDNA Library Construction. *Biotechniques* **2001**, *30*, 892–897, doi:10.2144/01304pf02.
173. Claro, I.M.; Ramundo, M.S.; Coletti, T.M.; Silva, C.A.M.; Valenca, I.N.; Candido, D.S.; Sales, F.C.S.; Manuli, E.R.; Jesus, J.G. De; Paula, A. De; et al. Rapid Viral Metagenomics Using SMART-9N Amplification and Nanopore Sequencing. *Wellcome Open Res* **2023**, *6*, doi:10.12688/wellcomeopenres.17170.2.
174. Manso, C.F.; Bibby, D.F.; Mbisa, J.L. Efficient and Unbiased Metagenomic Recovery of RNA Virus Genomes from Human Plasma Samples. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4173, doi:10.1038/s41598-017-02239-5.
175. Frey, K.G.; Herrera-Galeano, J.E.; Redden, C.L.; Luu, T. V.; Servetas, S.L.; Mateczun, A.J.; Mokashi, V.P.; Bishop-Lilly, K.A. Comparison of Three Next-Generation Sequencing Platforms for Metagenomic Sequencing and Identification of Pathogens in Blood. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 96, doi:10.1186/1471-2164-15-96.
176. Gu, W.; Miller, S.; Chiu, C.Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu. Rev. Pathol.* **2019**, *14*, 319–338, doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
177. L., G.A. The Challenge of Diagnostic Metagenomics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2018**, *18*, 605–615, doi:10.1080/14737159.2018.1487292.
178. López-Labrador, F. X., Brown, J. R., Fischer, N., Harvala, H., Van Boheemen, S., Cinek,

- O., Sayiner, A., Madsen, T. V., Auvinen, E., Kufner, V., Huber, M., Rodriguez, C.,... ESCV Network on Next-Generation Sequencing Recommendations for the Introduction of Metagenomic High-Throughput Sequencing in Clinical Virology, Part I: Wet Lab Procedure. *J. Clin. Virol.* **2021**, *134*, 104691, doi:10.1016/j.jcv.2020.104691.
179. Diao, Z.; Han, D.; Zhang, R.; Li, J. Metagenomics Next-Generation Sequencing Tests Take the Stage in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *J. Adv. Res.* **2021**, *38*, 201–212, doi:10.1016/j.jare.2021.09.012.
180. Goodacre, N.; Aljanahi, A.; Nandakumar, S.; Mikailov, M.; Khan, A.S. A Reference Viral Database (RVDB) To Enhance Bioinformatics Analysis of High-Throughput Sequencing for Novel Virus Detection. *mSphere* **2018**, *3*, e00069-18, doi:10.1128/mSphereDirect.00069-18.
181. Breitwieser, F.P.; Lu, J.; Salzberg, S.L. A Review of Methods and Databases for Metagenomic Classification and Assembly. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1125–1136, doi:10.1093/bib/bbx120.
182. Weyrich, L.S.; Farrer, A.G.; Eisenhofer, R.; Arriola, L.A.; Young, J.; Selway, C.A.; Handsley-Davis, M.; Adler, C.J.; Breen, J.; Cooper, A. Laboratory Contamination over Time during Low-Biomass Sample Analysis. *Mol. Ecol. Resour.* **2019**, *19*, 982–996, doi:10.1111/1755-0998.13011.
183. Chu, H.Y.; Kuypers, J.; Renaud, C.; Wald, A.; Martin, E.; Fairchok, M.; Magaret, A.; Sarancino, M.; Englund, J.A. Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Transmission in Childcare. *J. Clin. Virol.* **2013**, *57*, 343–350, doi:10.1016/j.jcv.2013.04.011.
184. Liu, W.; Zhang, H.; Zhao, T.; Cai, X.; Yang, L.; Gao, G.; Che, X.; Zhu, Z.; Zeng, T.; Cui, F. Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of an Outbreak on Respiratory Virus Coinfection in Gansu, China. *Viruses* **2024**, *16*, 540, doi:10.3390/v16040540.
185. Guo, Y. jun; Li, L.; Lai, Q. rui; Wang, Y. shuo; Li, W. Molecular Epidemiology of Human Parainfluenza Virus Type 3 in Children With Acute Respiratory Tract Infection in Hangzhou. *Influenza Other Respi. Viruses* **2024**, *18*, 1–6, doi:10.1111/irv.13351.

186. Košutić-Gulija, T., Slovic, A., Ljubin-Sternak, S., Mlinarić-Galinović, G., & Forčić, D. A Study of Genetic Variability of Human Parainfluenza Virus Type 1 in Croatia, 2011 – 2014. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 793–803, doi:10.1099/jmm.0.000297.
187. Li, H.; Du, Ā.J.; Yang, Ā.Y.; Cui, Ā.Y.; Fuqiang, G.Z.; Lu, C.Q.; Xi, L.; Wang, S.; Liu, Y. Outbreak of Human Parainfluenza Virus Type 1 in a Kindergarten from China, 2018. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **2020**, *15*, 25–30, doi:10.1055/s-0039-1695039.
188. Oh, D.Y.; Biere, B.; Grenz, M.; Wolff, T.; Schweiger, B.; Dürrwald, R.; Reiche, J. Virological Surveillance and Molecular Characterization of Human Parainfluenzavirus Infection in Children with Acute Respiratory Illness: Germany, 2015-2019. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1508, doi:10.3390/microorganisms9071508.
189. Šantak, M., Lang Balija, M., Mlinarić Galinović, G., Ljubin Sternak, S., Vilibić-Čavlek, T., & Tabain, I. Genotype Replacement of the Human Parainfluenza Virus Type 2 in Croatia between 2011 and 2017 – the Role of Neutralising Antibodies. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 1372–1383, doi:10.1017/S0950268818001693.
190. Shirai, T.; Mizukoshi, F.; Kimura, R.; Matsuoka, R.; Sada, M.; Shirato, K.; Ishii, H.; Ryo, A.; Kimura, H. Molecular Evolution of the Fusion (F) Genes in Human Parainfluenza Virus Type 2. *Microorganisms* **2025**, *13*, 399, doi:10.3390/microorganisms13020399.
191. Godoy, C., Peremiquel-Trillas, P., Andrés, C., Gimferrer, L., Uriona, S. M., Codina, M. G., Armadans, L., Martín, M.delC., Fuentes, F., Esperalba, J., Campins, M., Pumarola, T., & Antón, A. A Molecular Epidemiological Study of Human Parainfluenza Virus Type 3 at a Tertiary University Hospital during 2013 – 2015 in Catalonia, Spain. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *86*, 153–159, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.023.
192. Košutić-Gulija, T.; Slovic, A.; Ljubin-Sternak, S.; Mlinarić-Galinović, G.; Forčić, D. Genetic Analysis of Human Parainfluenza Virus Type 3 Obtained in Croatia, 2011-2015. *J Med Microbiol* **2017**, *66*, 502–510, doi:10.1099/jmm.0.000459.
193. Pan, Y.; Zhang, Y.; Shi, W.; Peng, X.; Cui, S.; Zhang, D.; Lu, G.; Liu, Y.; Wu, S.; Yang, P.; et al. Human Parainfluenza Virus Infection in Severe Acute Respiratory Infection Cases in Beijing, 2014-2016: A Molecular Epidemiological Study. *Influenza Other Respi. Viruses*

- 2017, *11*, 564–568, doi:10.1111/irv.12514.
194. Elusah, J.; Bulimo, W.D.; Opanda, S.M.; Symekher, S.L.; Wamunyokoli, F. Genetic Diversity and Evolutionary Analysis of Human Respirivirus Type 3 Strains Isolated in Kenya Using Complete Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) Gene. *PLoS One* **2020**, *15*, e0229355, doi:10.1371/journal.pone.0229355.
195. Kim, H.N.; Yoon, S.; Lim, C.S.; Lee, C.K.; Yoon, J. Phylogenetic Analysis of Human Parainfluenza Type 3 Virus Strains Responsible for the Outbreak during the COVID-19 Pandemic in Seoul, South Korea. *J. Clin. Virol.* **2022**, *153*, 105213, doi:10.1016/j.jcv.2022.105213.
196. Bando, H.; Kondo, K.; Kawano, M.; Komada, H.; Tsurudome, M.; Nishio, M.; Ito, Y. Molecular Cloning and Sequence Analysis of Human Parainfluenza Type 4A Virus HN Gene: Its Irregularities on Structure and Activities. *Virology* **1990**, *175*, 307–312, doi:10.1016/0042-6822(90)90213-b.
197. Kondo, K.; Bando, H.; Kawano, M.; Tsurudome, M.; Komada, H.; Nishio, M.; Ito, Y. Sequencing Analyses and Comparison of Parainfluenza Virus Type 4A and 4B NP Protein Genes. *Virology* **1990**, *174*, 1–8, doi:10.1016/0042-6822(90)90047-u.
198. Kondo, K.; Bando, H.; Tsurudome, M.; Kawano, M.; Nishio, M.; Ito, Y. Sequence Analysis of the Phosphoprotein (P) Genes of Human Parainfluenza Type 4A and 4B Viruses and RNA Editing at Transcript of the P Genes: The Number of G Residues Added Is Imprecise. *Virology* **1990**, *178*, 321–326, doi:10.1016/0042-6822(90)90413-1.
199. Kondo, K.; Fujii, M.; Nakamura, T.; Bando, H.; Kawano, M.; Tsurudome, M.; Komada, H.; Kusakawa, S.; Nishio, M.; Ito, Y. Sequence Characterization of the Matrix Protein Genes of Parainfluenza Virus Types 4A and 4B. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 2283–2287, doi:10.1099/0022-1317-72-9-2283.
200. Yea, C.; Cheung, R.; Collins, C.; Adachi, D.; Nishikawa, J.; Tellier, R. The Complete Sequence of a Human Parainfluenzavirus 4 Genome. *Viruses* **2009**, *1*, 26–41, doi:10.3390/v1010026.

201. Komada, H.; Kawano, M.; Uefuji, A.; Ito, M.; Tsurudome, M.; Hatakeyama, E.; Nakanishi, M.; Sakue, S.; Joh, C.; Suzumura, E.; et al. Completion of the Full-Length Genome Sequence of Human Parainfluenza Virus Types 4A and 4B : Sequence Analysis of the Large Protein Genes and Gene Start , Intergenic and End Sequences. *Arch. Virol.* **2011**, *156*, 161–166, doi:10.1007/s00705-010-0834-6.
202. Lednicky, J.A.; Waltzek, T.B.; Halpern, M.D.; Hamilton, S.B. Comparative Analysis of the Full-Length Genome Sequence of a Clinical Isolate of Human Parainfluenza Virus 4B. *Scientifica (Cairo)*. **2012**, *2012*, 4–7, doi:10.6064/2012/871201.
203. Alquezar-Planas, D.; Mourier, T.; Bruhn, C.; Hansen, A.; Vitcetz, S.; Mørk, S.; Gorodkin, J.; Nielsen, H.; Guo, Y.; Sethuraman, A.; et al. Discovery of a Divergent HPIV4 from Respiratory Secretions Using Second and Third Generation Metagenomic Sequencing. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, doi:10.1038/srep02468.
204. Bialasiewicz, S.; McVernon, J.; Nolan, T.; Lambert, S.; Zhao, G.; Wang, D.; Nissen, M.; Sloots, T. Detection of a Divergent Parainfluenza 4 Virus in an Adult Patient with Influenza like Illness Using Next-Generation Sequencing. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, doi:10.1186/1471-2334-14-275.
205. Henricksona, K.J.; Laura, S.M.K.; Sedmakb, J.; Savatski, L. Recovery of Human Parainfluenza Virus Types One and Two. *J. Virol. Methods* **1994**, *46*, 189–206, doi:10.1016/0166-0934(94)90103-1.
206. Moriuchi, H.; Oshima, T.; Nishimura, H.; Nakamura, K. Human Malignant Melanoma Cell Line (HMV-II) for Isolation of Influenza C and Parainfluenza Viruses. *J. Clin. Microbiol.* **1990**, *28*, 1147–1150, doi:10.1128/jcm.28.6.1147-1150.1990.
207. Miyata, H.; Kanazawa, T.; Shibuya, K.; Hino, S. Contamination of a Specific-Pathogen-Free Rat Breeding Colony with Human Parainfluenzavirus Type 3 Printed in Great Britain. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 733–741, doi:10.1099/vir.0.80666-0.
208. Indumathi, C.P.; Gunanasekaran, P.; Kaveri, K.; Arunagiri, K.; Mohana, S.; Sheriff, A.K.; Sureshbabu, B. V; Padmapriya, P.; Senthilraja, R.; Fathima, G. Isolation & Molecular Characterization of Human Parainfluenza Virus in Chennai , India. *Indian J. Med. Res.*

- 2015, 142, 583–590, doi:10.4103/0971-5916.171287.
209. Fukushima, K., Takahashi, T., Takaguchi, M., Ueyama, H., Ito, S., Kurebayashi, Y., Kawanishi, T., McKimm-Breschkin, J. L., Takimoto, T., Minami, A., & Suzuki, T. Plaque Formation Assay for Human Parainfluenza Virus Type 1. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, 34, 996–1000, doi:10.1248/bpb.34.996.
210. Mahony, J.B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, 21, 716–747, doi:10.1128/CMR.00037-07.
211. Killian, M.L. Hemagglutination Assay for the Avian Influenza Virus. *Methods Mol. Biol.* **2008**, 436, 47–52, doi:10.1007/978-1-59745-279-3_7.
212. Kaufmann, L.; Syedbasha, M.; Vogt, D.; Hollenstein, Y.; Hartmann, J.; Linnik, J.E.; Egli, A. An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) Assay to Quantify Influenza-Specific Antibody Titers. *J. Vis. Exp.* **2017**, 130, 55833, doi:10.3791/55833.
213. Кривицкая, В.З.; Кузнецова, Е.В.; Майорова, В.Г.; Кадырова, Р.А.; Львов, Н.И.; Го, А.А.; Соминина, А.А. Реакция Микронеutralизации в Сравнении с Реакцией Торможения Гемагглютинации При Оценке Иммуногенности Гриппозных Вакцин и Диагностики Гриппа. *Инфекция и иммунитет* **2019**, 9, 763–772, doi:10.15789/2220-7619-2019-5-6-763-772.
214. Yang, J.; Kisu, T.; Watanabe, O.; Kitai, Y.; Ohmiya, S.; Fan, Y.; Nishimura, H. Analysis of Neuraminidase Activity of Human Parainfluenza Viruses Using Enzyme-Linked Lectin Assay and BTP3-Neu5Ac Assay. *Microbiol. Immunol.* **2024**, 68, 371–380, doi:10.1111/1348-0421.13170.
215. Lauring, A.S.; Andino, R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathog.* **2010**, 6, 1–8, doi:10.1371/journal.ppat.1001005.
216. Puig-Barberà, J.; Tormos, A.; Trushakova, S.; Sominina, A.; Pisareva, M.; Ciblak, M.; Badur, S.; Yu, H.; Cowling, B.; Burtseva, E. The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN): A New Platform to Describe the Epidemiology of Severe Influenza. *Influenza Other Respi. Viruses* **2015**, 9, 277–286, doi:10.1111/irv.12335.

217. Методы Определения Показателей Качества Иммунобиологических Препаратов Для Профилактики и Диагностики Гриппа: Методические Указания МУ 3.3.2.1758-03 (Утв. Главным Государственным Санитарным Врачом РФ 28 Сентября 2003 Г.). 6–11.
218. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780, doi:10.1093/molbev/mst010.
219. Menardo, F.; Loiseau, C.; Brites, D.; Coscolla, M.; Gygli, S.M.; Rutaihwa, L.K.; Trauner, A.; Beisel, C.; Borrell, S.; Gagneux, S. Treemmer: A Tool to Reduce Large Phylogenetic Datasets with Minimal Loss of Diversity. *BMC Bioinformatics* **2018**, *19*, 1–8, doi:10.1186/s12859-018-2164-8.
220. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027, doi:10.1093/molbev/msab120.
221. Martin, D.P.; Varsani, A.; Roumagnac, P.; Botha, G.; Maslamoney, S.; Schwab, T.; Kelz, Z.; Kumar, V.; Murrell, B.; Africa, S.; et al. RDP5: A Computer Program for Analyzing Recombination in , and Removing Signals of Recombination from , Nucleotide Sequence Datasets. *Virus Evol.* **2021**, *7*, veaa087, doi:10.1093/ve/veaa087.
222. Кокорева, С.П.; Разуваев, О.А.; Макарова, А.В.; Котлова, В.Б. Этиология Острых Респираторных Инфекций На Фоне Развития Пандемии COVID-19. *PMЖ. Мать и дитя* **2025**, *8*, 353–359, doi:0.32364/2618-8430-2025-8-4-11.
223. Даниленко, Д.М.; Соминина, А.А.; Комиссаров, А.Б.; Писарева, М.М.; Столяров, К.А.; Мусаева, Т.Д.; Едер, В.; Бакаев, М.И.; Комиссарова, К.С.; Иванова, А.А.; et al. Этиология Тяжелой Острой Респираторной Вирусной Инфекции в Эпидемические Сезоны 2015–2020 Гг. *терапия* **2021**, *4*, 1–11, doi:10.18565/therapy.2021.4.7-17.
224. 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**, *25*, 13119, doi:10.3390/ijms252313119.

225. 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**, *17*, 1197, doi:10.3390/v17091197.
226. Mansour, O.; Fadeev, A. V; Perederiy, A.A.; Ksenafontov, A.D.; Boyarintseva, A.Y.; Danilenko, D.M.; Lioznov, D.A.; Komissarov, A.B. Whole-Genome Phylogenetic Characterization of Human Parainfluenza Virus Type 4 Circulating in St . Petersburg , Russia. *Viruses* **2026**, *18*, 497, doi:10.3390/v18050497.
227. Mizuta, K.; Abiko, C.; Aoki, Y.; Ikeda, T.; Itagaki, T.; Katsushima, F.; Katsushima, Y.; Matsuzaki, Y.; Noda, M.; Kimura, H.; et al. Epidemiology of Parainfluenza Virus Types 1, 2 and 3 Infections Based on Virus Isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiol. Immunol.* **2012**, *56*, 855–858, doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00507.x.
228. Schepetiuk, S. K., & Kok, T. The Use of MDCK, MEK and LLC-MK2 Cell Lines with Enzyme Immunoassay for the Isolation of Influenza and Parainfluenza Viruses from Clinical Specimens. *Journal of Virological Methods. J. Virol. Methods* **1993**, *42*, 241–250, doi:10.1016/0166-0934(93)90036-q.
229. Sato, K.; Watanabe, O.; Ohmiya, S.; Chiba, F.; Hayashi, M.; Suzuki, T.; Kawakami, K.; Nishimura, H. Efficient Isolation of Human Parainfluenza Viruses 1 and 3 Using MNT-1, a Human Malignant Melanoma Cell Line System That Exhibits an Apparent Cytopathic Effect. *Microbiol. Immunol.* **2016**, *60*, 801–805, doi:10.1111/1348-0421.12446.
230. Tao, T.A.O.; Durbin, A.P.; Whitehead, S.S.; Davoodi, F.; Collins, P.L.; Murphy, B.R. Recovery of a Fully Viable Chimeric Human Parainfluenza Virus (PIV) Type 3 in Which the Hemagglutinin-Neuraminidase and Fusion Glycoproteins Have Been Replaced by Those of PIV Type 1. *J. Virol.* **1998**, *72*, 2955–2961, doi:10.1128/JVI.72.4.2955-2961.1998.
231. Tang, C.; Segovia, K.; McElroy, J.; Li, T.; Guan, M.; Zhang, X.; Misra, S.; Hang, J.; Wan, X. Cell-Adapted Mutations and Antigenic Diversity of Influenza B Viruses in Missouri, 2019-2020 Season. *Viruses* **2021**, *13*, 1896, doi:10.3390/v13101896.

232. Kistler, K.; Bedford, T. Seasonal Influenza Viruses Show Distinct Adaptive Dynamics During Growth in Chicken Eggs. *Mol. Biol. Evol.* **2025**, *42*, msaf227, doi:10.1093/molbev/msaf227.
233. Vigerust, D.J.; Shepherd, V.L. Virus Glycosylation: Role in Virulence and Immune Interactions. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 211–218, doi:10.1016/j.tim.2007.03.003.
234. Feng, T.; Zhang, J.; Chen, Z.; Pan, W.; Chen, Z.; Yan, Y.; Dai, J. Glycosylation of Viral Proteins: Implication in Virus – Host Interaction and Virulence. *Virulence* **2022**, *13*, 670–683, doi:10.1080/21505594.2022.2060464.
235. Alymova, I. V.; Taylor, G.; Mishin, V.P.; Watanabe, M.; Murti, K.G.; Boyd, K.; Chand, P.; Babu, Y.S.; Portner, A. Loss of the N-Linked Glycan at Residue 173 of Human Parainfluenza Virus Type 1 Hemagglutinin-Neuraminidase Exposes a Second Receptor-Binding Site □. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8400–8410, doi:10.1128/JVI.00474-08.
236. Matsuoka, Y.; Ray, R.; Compans, R.W. Sequence of the Hemagglutinin-Neuraminidase Gene of Human Parainfluenza Virus Type 1. *Virus Res.* **1990**, *16*, 107–113, doi:10.1016/0168-1702(90)90047-F.
237. Henrickson, K.J.; Savatski, L.L. Antigenic Structure, Function, and Evolution of the Hemagglutinin- Neuraminidase Protein of Human Parainfluenza Virus Type 1. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176*, 867–875, doi:10.1086/516533.
238. Palermo, L.M.; Porotto, M.; Greengard, O.; Moscona, A. Fusion Promotion by a Paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: PH Modulation of Receptor Avidity of Binding Sites I and II. *J. Virol.* **2007**, *81*, 9152–9161, doi:10.1128/jvi.00888-07.
239. Mizuta, K.; Tsukagoshi, H.; Ikeda, T.; Aoki, Y.; Abiko, C.; Itagaki, T.; Nagano, M.; Noda, M.; Kimura, H. Molecular Evolution of the Haemagglutinin- Neuraminidase Gene in Human Parainfluenza Virus Type 3 Isolates from Children with Acute Respiratory Illness in Yamagata Prefecture, Japan. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 570–577, doi:10.1099/jmm.0.068189-0.
240. Tappert, M.M.; Smith, D.F.; Air, G.M. Fixation of Oligosaccharides to a Surface May

- Increase the Susceptibility to Human Parainfluenza Virus 1, 2, or 3 Hemagglutinin-Neuraminidase. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12146–12159, doi:10.1128/jvi.05537-11.
241. Xu, R.; Palmer, S.G.; Porotto, M.; Palermo, L.M.; Niewiesk, S.; Wilson, I.A.; Moscona, A. Interaction between the Hemagglutinin-Neuraminidase and Fusion Glycoproteins of Human Parainfluenza Virus Type III Regulates Viral Growth in Vivo. *MBio* **2013**, *4*, 1–11, doi:10.1128/mBio.00803-13.
242. Moscona, A.; Peluso, R.W. Relative Affinity of the Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase for Sialic Acid Correlates with Virus-Induced Fusion Activity. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6463–6468, doi:10.1128/jvi.67.11.6463-6468.1993.
243. Chu, F. lu; Wen, H. ling; Hou, G. hua; Lin, B.; Zhang, W. qiang; Song, Y. yan; Ren, G. jie; Sun, C. xi; Li, Z. mei; Wang, Z. Role of N-Linked Glycosylation of the Human Parainfluenza Virus Type 3 Hemagglutinin-Neuraminidase Protein. *Virus Res.* **2013**, *174*, 137–147, doi:10.1016/j.virusres.2013.03.012.
244. Komada, H.; Ito, M.; Nishio, M.; Kawano, M.; Ohta, H.; Tsurudome, M.; Kusagawa, S.; O'Brien, M.; Bando, H.; Ito, Y. N-Glycosylation Contributes to the Limited Cross-Reactivity between Hemagglutinin Neuraminidase Proteins of Human Parainfluenza Virus Type 4A and 4B. *Med. Microbiol. Immunol.* **2000**, *189*, 1–6, doi:10.1007/pl00008251.
245. Chare, E.R.; Gould, E.A.; Holmes, E.C.; Holmes, E. Phylogenetic Analysis Reveals a Low Rate of Homologous Recombination in Negative-Sense RNA Viruses. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2691–2703, doi:10.1099/vir.0.19277-0.
246. Spann, K.M.; Collins, P.L.; Teng, M.N. Genetic Recombination during Coinfection of Two Mutants of Human Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol.* **2003**, *77*, 11201–11211, doi:10.1128/jvi.77.20.11201-11211.2003.
247. Rui, Z.; Juan, P.; Jingliang, S.; Jixun, Z.; Xiaoting, W.; Shouping, Z.; Xiaojiao, L.; Guozhong, Z. Phylogenetic Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated in the Mainland of China during 2001 – 2009. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 246–257, doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.020.

ПРИЛОЖЕНИЕ

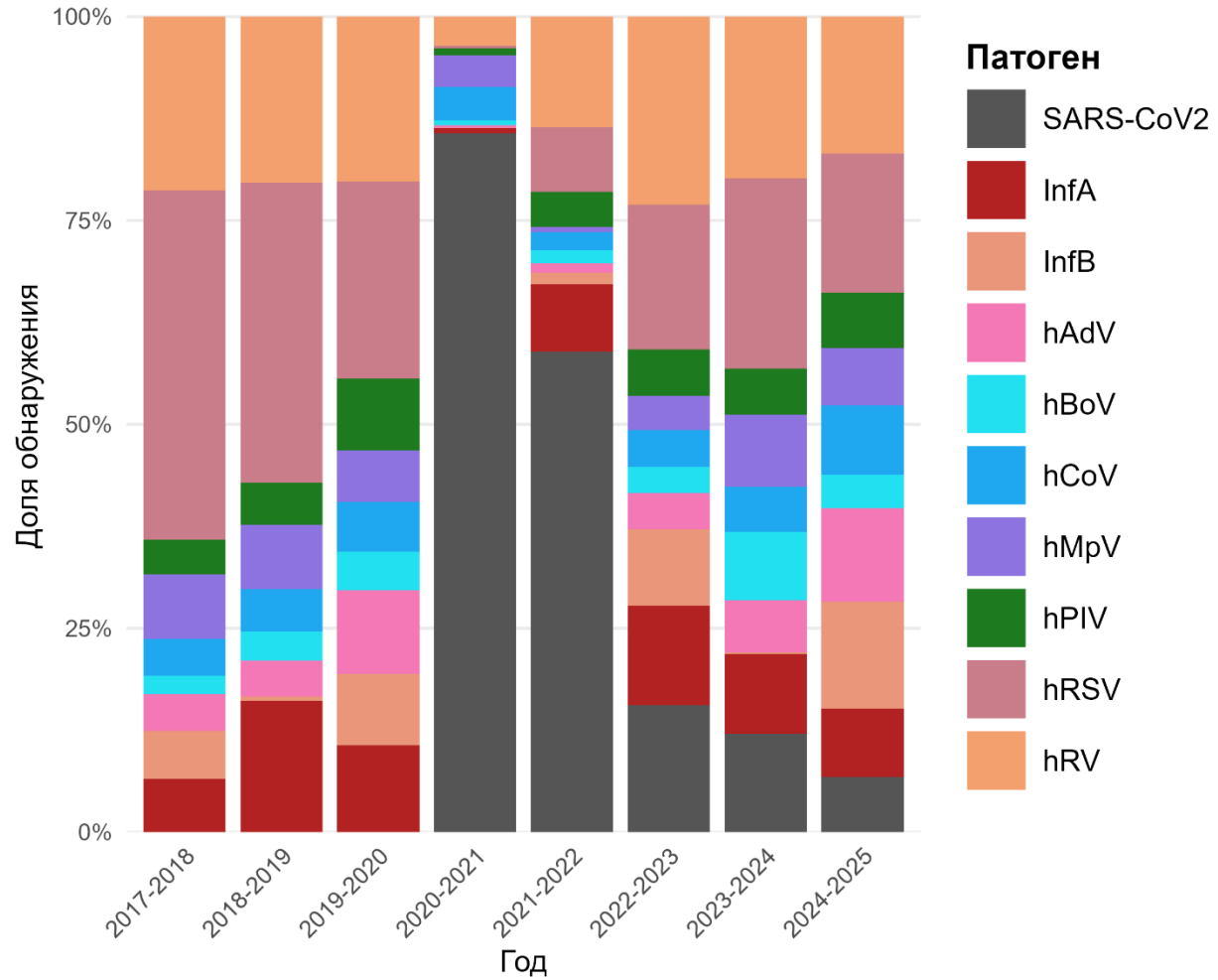


Рисунок П1. Доля распределение острых респираторных вирусных инфекций в период с 2017 по 2025 год.