Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(2):214-221
DOI 10.18699/VJGB-22-26

Перевод на английский язык https://vavilov.elpub.ru/jour

Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*

Н.Б. Рудометова ✉, Д.Н. Щербаков, А.П. Рудометов, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
✉ nadenkaand100@mail.ru

Аннотация. ВИЧ-инфекция по-прежнему остается одной из глобальных проблем здравоохранения во всем мире. Борьба с инфекцией ведется по нескольким направлениям. Во-первых, это профилактические мероприятия, которые включают просвещение населения по проблеме ВИЧ/СПИДа, пропаганду здорового образа жизни, защищенные половые контакты, доконтактную профилактику уязвимых групп населения. Во-вторых, прохождение своевременного тестирования на ВИЧ и применение антиретровирусной терапии в случае его обнаружения. В-третьих, это научные исследования, связанные как с поиском новых лекарственных агентов, так и с разработкой вакцины против ВИЧ-1. Ключевой момент при определении эффективности вакцин и химиотерапевтических препаратов – выбор инструмента, позволяющего быстро и точно оценить их эффективность *in vitro*. Классическим методом вирусологии, позволяющим оценить нейтрализующую активность сывороток животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами, и эффективность химиотерапевтических агентов, является метод нейтрализации с использованием вирусных изолятов, а также инфекционных молекулярных клонов, которые представляют собой инфекционные вирусные частицы, полученные путем трансфекции клеток плазмидным вектором, содержащим полноразмерный геном ВИЧ-1, кодирующий структурные, регуляторные и вспомогательные белки вируса, необходимые для образования репликационно-компетентных вирусных частиц в культуре клеток. При этом метод нейтрализации с использованием вирусных изолятов и инфекционных молекулярных клонов отличается трудоемкостью, продолжительностью и требует повышенных мер биобезопасности. Альтернативным решением, устраняющим указанные недостатки и позволяющим проводить быстрый скрининг, является использование для анализа нейтрализующей активности псевдовирусов, которые представляют собой рекомбинантные вирусные частицы. В отличие от инфекционных вирусов, работа с псевдовирусами безопасна, поскольку геном псевдовирусов нарушен для того, чтобы их инфекция ограничивалась лишь одним циклом. Данный обзор посвящен описанию модельных вирусных систем, используемых для оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*: первичных изолятов ВИЧ-1 и лабораторно-адаптированных штаммов, инфекционных молекулярных клонов и *env*-псевдовирусов. Кратко представлена их сравнительная характеристика. Более подробно описана технология *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.
Ключевые слова: ВИЧ-1; первичные изоляты; инфекционные молекулярные клоны; *env*-псевдовирусы; анализ нейтрализации вируса.

Для цитирования: Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):214-221. DOI 10.18699/VJGB-22-26

Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1

N.B. Rudometova ✉, D.N. Shcherbakov, A.P. Rudometov, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia
✉ nadenkaand100@mail.ru

Abstract. HIV infection still remains a major challenge for healthcare systems of the world. There are several aspects on counteracting the HIV/AIDS epidemic. The first aspect covers preventive measures including educational campaigns on HIV/AIDS and promotion of a healthy lifestyle, protected sex, and pre-exposure prophylaxis of vulnerable groups. The second aspect is timely HIV testing and the use of antiretroviral therapy when test results come back positive. The third aspect is the scientific research associated with discovering new pharmaceutical agents and developing HIV-1 vaccines. Selecting an adequate tool for quick and accurate *in vitro* efficacy assessment is the key aspect for efficacy assessment of vaccines and chemotherapy drugs. The classical method of virology, which makes it possible to evaluate the neutralizing activity of the sera of animals immunized with experimental vaccines and the efficacy of

© Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., 2022
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

chemotherapy agents is the method of neutralization using viral isolates and infectious molecular clones, i.e. infectious viral particles obtained via cell transfection with a plasmid vector including the full-length HIV-1 genome coding structural, regulatory, and accessory proteins of the virus required for the cultivation of replication-competent viral particles in cell culture. However, neutralization assessment using viral isolates and infectious molecular clones is demanding in terms of time, effort, and biosafety measures. An alternative eliminating these disadvantages and allowing for rapid screening is the use of pseudoviruses, which are recombinant viral particles, for the analysis of neutralizing activity. Pseudotyped viruses have defective genomes restricting their replication to a single cycle, which renders them harmless compared to infectious viruses. The present review focuses on describing viral model systems for *in vitro* efficacy assessment of vaccines and drugs against HIV-1, which include primary HIV-1 isolates, laboratory-adapted strains, infectious molecular clones, and *env*-pseudoviruses. A brief comparison of the listed models is presented. The HIV-1 *env*-pseudoviruses approach is described in more detail.
Key words: HIV-1; primary isolates; infectious molecular clones; *env*-pseudoviruses; virus neutralization assay.

For citation: Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):214-221. DOI 10.18699/VJGB-22-26

Введение

Пандемия ВИЧ/СПИДа остается одной из глобальных проблем мирового здравоохранения, вовлекая в ряды инфицированных около двух миллионов человек ежегодно[1]. В настоящее время основным способом лечения ВИЧ-инфекции является применение антиретровирусной терапии, позволяющей снижать уровень вирусной нагрузки, улучшать качество и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов. Однако известные антиретровирусные препараты имеют и существенные недостатки, такие как высокая стоимость лечения, выраженные побочные эффекты, развитие резистентности к применяемым препаратам, необходимость в периодическом изменении схем лечения и регулярный прием препаратов в течение всей жизни (Arts, Hazuda, 2012). Более того, до сих пор не разработан препарат, способный полностью излечить человека от ВИЧ-инфекции (Phanuphak, Gulick, 2020). Поэтому приоритетным направлением в борьбе с ВИЧ/СПИД по-прежнему остается создание эффективной профилактической вакцины (Stephenson et al., 2020).

На сегодняшний день наиболее успешными были клинические испытания RV144, которые проводились в Таиланде с 2003 по 2009 г. Эффективность исследуемой вакцины составила 60 % через 12 месяцев после вакцинации и 31.2 % после трех с половиной лет наблюдения (Kim et al., 2015). Спустя несколько лет компоненты вакцины из клинических испытаний RV144 были адаптированы для экспрессии антигенов штаммов ВИЧ, циркулирующих в Южной Африке. В январе 2020 г. были подведены предварительные итоги клинических испытаний, которые показали, что модифицированная вакцина не предотвращала инфицирование ВИЧ-1 среди добровольцев (Gray et al., 2021). В области вакцинологии ВИЧ-1 остается еще много нерешенных вопросов и проблем, но при этом ясно, что для разработки эффективной вакцины необходимо использовать новые подходы по ее дизайну (Hsu, O'Connell, 2017). Поэтому сейчас активно разрабатываются различные направления и подходы, способные обеспечить индукцию защитного как Т-, так и В-клеточного иммунного ответа против ВИЧ-1, включая широконейтрализующие антитела (bnAbs) (Shcherbakov et al., 2015; Rudometov et al., 2019b; Jones et al., 2020; Liu et al., 2020; Ng'uni et al., 2020).

Неотъемлемой частью научных исследований, связанных с созданием вакцины и химиотерапевтических препаратов против вирусных патогенов, включая ВИЧ-1, является выбор инструмента, позволяющего оценить их эффективность *in vitro*. Классический метод вирусологии, позволяющий оценить нейтрализующую активность сывороток животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами, и эффективность химиотерапевтических агентов, – это метод нейтрализации с помощью вирусных изолятов (Jackson et al., 1988). Однако данный метод отличается трудоемкостью, продолжительностью и требует повышенных мер биобезопасности. Альтернативой вирусным изолятам является использование инфекционных молекулярных клонов, которые представляют собой инфекционные вирусные частицы, полученные путем трансфекции клеток плазмидным вектором, содержащим полноразмерный геном ВИЧ-1, кодирующий структурные, регуляторные и вспомогательные белки вируса, необходимые для образования репликационно-компетентных вирусных частиц в культуре клеток (Peden et al., 1991).

В последние годы многие исследователи отдают приоритет технологии псевдовирусов – безопасному методу, позволяющему работать в условиях BSL-2 (Li Q. et al., 2018; Montefiori et al., 2018). В отличие от изолятов вируса и инфекционных молекулярных клонов, работа с псевдовирусами безопасна, поскольку в кодирующие области генома внесены мутации, ограничивающие развитие вируса только одним циклом, поэтому псевдовирусы нередко называют «вирусами одного цикла инфекции» (Чересиз и др., 2010; Li Q. et al., 2018).

В данном обзоре будут рассмотрены модельные системы ВИЧ-1, используемые для оценки эффективности химиотерапевтических препаратов, широконейтрализующих антител и кандидатных вакцин против ВИЧ-1 *in vitro*.

Изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1

Исторически самой первой системой, которая использовалась для оценки эффективности вакцин и анализа нейтрализующей активности антител, были первичные изоляты ВИЧ-1 (Jackson et al., 1988). Изоляты вируса полу-

[1] Информационный бюллетень по ВИЧ/СПИД. Всемирная организация здравоохранения, 2020. Режим доступа: URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids (дата обращения 02.06.2021).

чают путем совместного культивирования мононуклеаров периферической крови (МПК) ВИЧ-положительного пациента с ФГА-стимулированными МПК здорового донора. При этом выделенные из крови вирусы представляют собой генетически неоднородную популяцию вследствие квазивидовой природы ВИЧ-1. Для того чтобы исключить возможное селективное давление на вирусные изоляты и обеспечить наиболее оптимальное сохранение фенотипа вируса, его наработку ведут на первичных культурах клеток, а не на перевиваемых клеточных линиях (Voronin et al., 2007; Van't Wout et al., 2008). Как правило, для определения наличия нейтрализующих антител в сыворотках, полученных от вакцинированных, или эффективности исследуемого антивирусного агента, анализ нейтрализации также проводят на клеточной культуре МПК с добавлением инфекционной дозы вируса и серийных разведений иммунной сыворотки или тестируемого соединения. Оценку подавления репликации ВИЧ-1 выполняют с помощью ИФА путем измерения концентрации белка p24 (структурный компонент капсида ВИЧ-1) в культуральной среде (Зырянова и др., 2020).

Применение первичных изолятов ВИЧ-1 для анализа вируснейтрализации имеет ряд недостатков, среди которых можно выделить репликацию возбудителя на первичных клетках МПК, повышенные требования к биобезопасности, низкую воспроизводимость результатов и, как следствие, сложность стандартизации (Mascola et al., 1996, 2005). Поэтому в первые годы разработки вакцины для простоты и воспроизводимости экспериментов некоторые штаммы ВИЧ-1 (IIIB/LAV, MN, SF2) были адаптированы для репликации в иммортализованных клеточных линиях (H9, CEM) и названы лабораторно-адаптированными штаммами или, точнее, вирусами, адаптированными к Т-клеточной линии. Позже было показано, что вакцинация добровольцев рекомбинантными тримерами, полученными на основе лабораторно-адаптированных штаммов ВИЧ-1, приводила к индукции антител, которые нейтрализовали именно эти лабораторные штаммы. Однако дополнительные эксперименты с использованием первичных изолятов ВИЧ-1 показали, что, несмотря на мощную индукцию нейтрализующих антител против лабораторно-адаптированных штаммов, нейтрализующая активность в отношении первичных изолятов отсутствовала (Mascola et al., 1996; Montefiori et al., 2018). Вследствие этого при использовании лабораторно-адаптированных штаммов вируса для анализа нейтрализации могли быть получены ошибочные данные, что снова привело исследователей к первичным изолятам как более адекватному инструменту для анализа вируснейтрализующей активности антител, образующихся в результате вакцинации. Поскольку данный метод является трудоемким и не позволяет проводить массовый анализ, его стали применять на заключительных этапах исследований.

Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1

Как было отмечено выше, первичные изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1 характеризуются трудоемкостью культивирования и значительной разнородностью вследствие своей природы, а также вариабельности донорских МПК (Polonis et al., 2008), поэтому для стабильного воспроизведения вирусных частиц стали использовать инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1 (ИМК). Их получают путем трансфекции клеток плазмидным вектором, который содержит полноразмерный геном ВИЧ-1, обеспечивающий образование вирусных частиц, обладающих способностью к дальнейшей репликации в культуре эукариотических клеток (рис. 1). В результате формируются генетически однородные вирусные частицы, в отличие от первичных изолятов ВИЧ-1, так как геном вируса находится в виде ДНК в составе плазмидного вектора (Edmonds et al., 2010; Zyryanova et al., 2020). Для возможности стандартизации анализа нейтрализации с ИМК, с помощью методов генетической инженерии были созданы модифицированные перевиваемые клеточные линии, несущие на своей поверхности рецептор CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4 (Princen et al., 2004; González et al., 2010). Поскольку ИМК представляют собой инфекционные вирусные частицы, то экспериментальная работа с ними, так же как и с первичными изолятами и лабораторно-адаптированными штаммами, требует соблюдения соответствующих мер биобезопасности и отличается продолжительностью анализа.

В то же время использование ИМК позволяет характеризовать и исследовать биологические свойства генетически различных изолятов ВИЧ-1 (Ochsenbauer et al., 2012; Baalwa et al., 2013; Wang et al., 2013; Chenine et al., 2018; Zyryanova et al., 2020), изучать механизмы возникновения лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ-1 и влияние мутаций на биологические свойства вируса (Johnston et al., 2005; Pugach et al., 2007; Varghese et al., 2013), а также проводить поиск новых антиретровирусных агентов (Su et al., 2019; Wagstaff et al., 2019; Mavian et al., 2020).

Env-псевдовирусы ВИЧ-1

При использовании классических вирусологических методов для работы с ВИЧ-1 исследователи сталкиваются с рядом сложностей, отмеченных выше. Для быстрой и адекватной оценки гуморального иммунного ответа, возникающего в ответ на вакцинные конструкции, и скрининга потенциальных химиотерапевтических агентов, а именно ингибиторов проникновения, наилучшим образом себя зарекомендовала технология *env*-псевдовирусов (Montefiori et al., 2018).

Env-псевдовирусы ВИЧ-1 представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, полученные путем трансфекции эукариотических клеток двумя плазмидами – коровой и оболочечной. Коровая плазмида содержит гены структурных (Gag и Pol), регуляторных (Tat и Rev) и вспомогательных (Vpu, Vpr, Vif и Nef) белков ВИЧ-1, которые необходимы для сборки вирусных частиц, а также последовательности, необходимые для упаковки вирусной РНК (Ψ). Оболочечная плазмида несет ген поверхностного гликопротеина (Env) определенного подтипа ВИЧ-1. В результате трансфекции происходит формирование вирусных частиц с дефектным геномом, не способным обеспечить сборку инфекционных дочерних вирионов при заражении (Li M. et al., 2005; Li Q. et al., 2018). С помощью электронной микроскопии показано, что при трансфекции

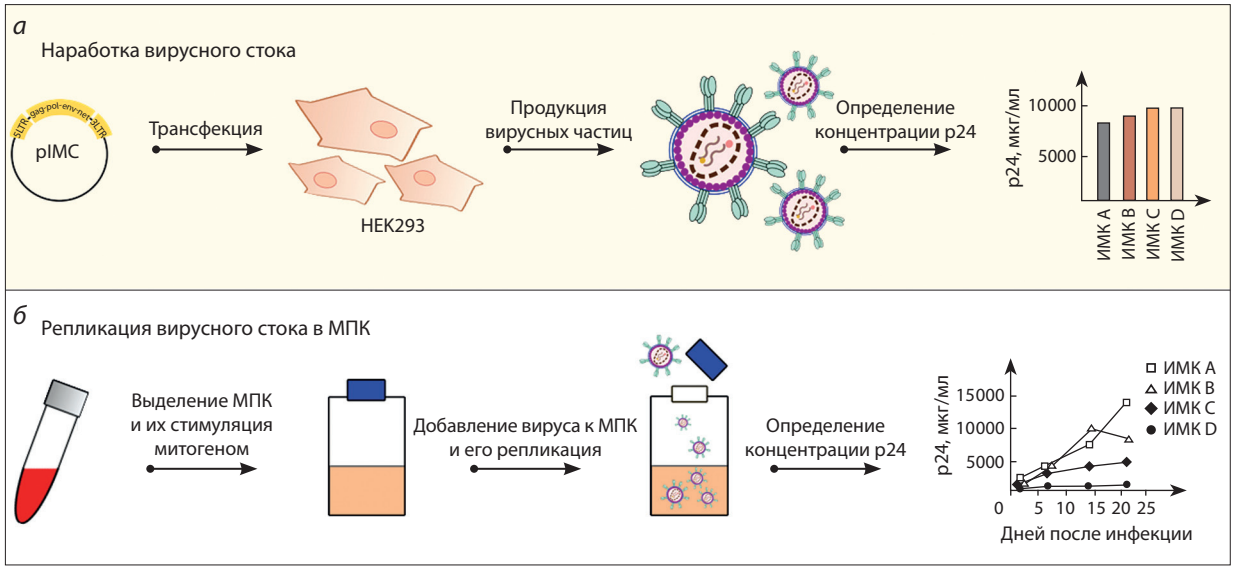

Рис. 1. Схема работы с ИМК ВИЧ-1.

Условно получение ИМК ВИЧ-1 можно разделить на два этапа. Первый этап (*а*) включает трансфекцию клеточной линии HEK293 для продукции вирусных частиц, так называемого вирусного стока. На втором этапе (*б*) проводят последующую репликацию вирусного стока с использованием ФГА-стимулированных МПК здорового донора в течение нескольких недель. На каждом из этих этапов титр вирусных частиц оценивают с помощью ИФА путем определения концентрации p24 антигена в культуральной среде. Увеличение концентрации капсидного белка p24 не менее чем в тысячу раз по сравнению с его начальной концентрацией в культуральной среде свидетельствует о продукции репликационно-компетентных вирусов.

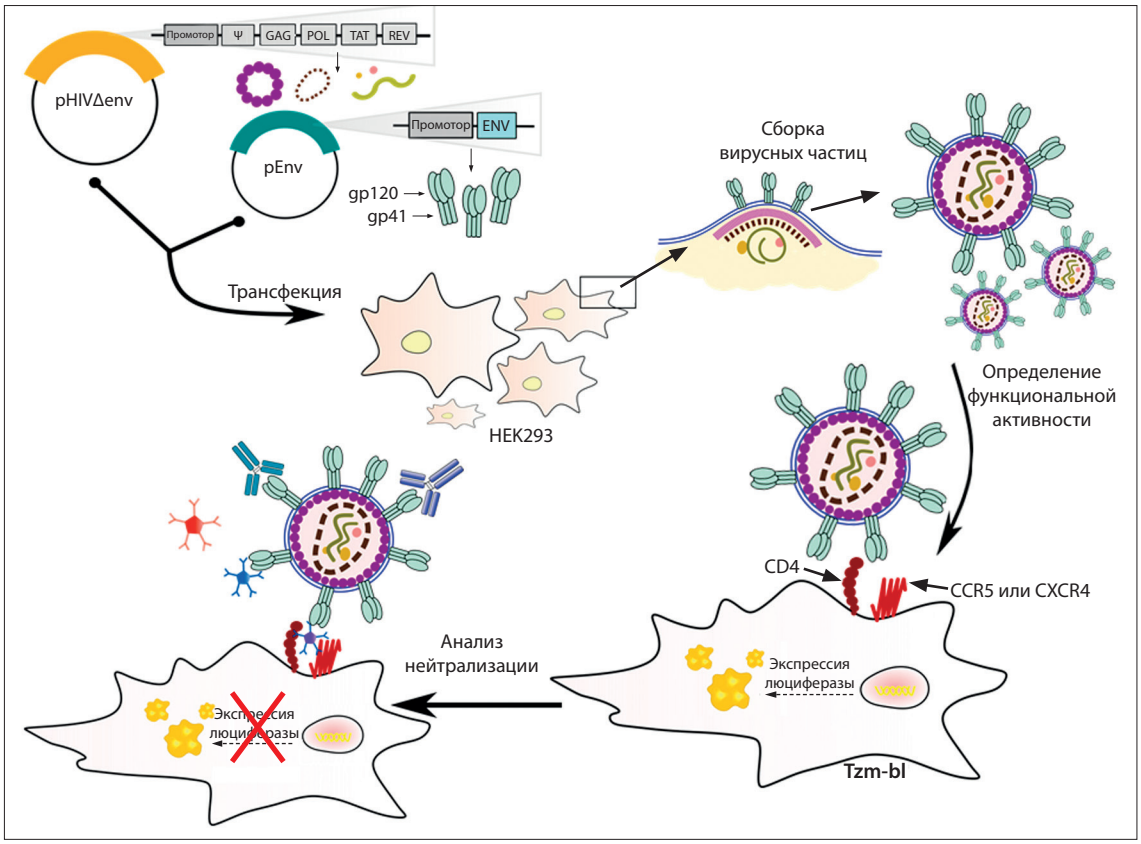

Рис. 2. Схема работы с *env*-псевдовирусной системой ВИЧ-1.

Экспериментальная работа с *env*-псевдовирусами включает несколько этапов: первый – сборка вирусных частиц с помощью трансфекции клеточной линии HEK293 с использованием двух плазмид – коровой и оболочечной; второй – определение функциональной активности псевдовирусных частиц, т. е. способности заражать клетки-мишени и активировать репортерный ген люциферазы светлячка; третий этап – непосредственно анализ нейтрализации с использованием иммунных сывороток или химиотерапевтических агентов с целью определения их способности блокировать проникновение псевдовирусов в клетку-мишень.

Сравнительная характеристика модельных систем ВИЧ-1,
используемых для оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*

Параметр	*Env*-псевдовирусы	Инфекционные молекулярные клоны	Первичные изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы
Требования к биобезопасности (опасность)	Низкие	Высокие	Высокие
Скорость и производительность анализа	Высокая	Низкая	Низкая
Стандартизация	Высокая	Высокая	Низкая
Изучение различных свойств вируса и вирусного цикла	Только этап проникновения вируса в клетку-мишень	Все этапы жизненного цикла ВИЧ-1	Все этапы жизненного цикла ВИЧ-1
Условия культивирования	Перевиваемые клеточные линии	Перевиваемые клеточные линии; МПК	МПК

клеточной линии HEK293 двумя плазмидами формируются вирусные частицы, морфологически идентичные вирионам ВИЧ-1 (Zaitsev et al., 2019; Ladinsky et al., 2020).

Определение функциональной активности *env*-псевдовирусов и анализ нейтрализации проводят на клеточной линии TZM-bl, которая является перевиваемой, генетически модифицированной клеточной линией HeLa и на поверхности которой локализованы рецепторы CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4. Кроме того, в геном клеточной линии TZM-bl интегрированы репортерные гены люциферазы светлячка и β-галактозидазы *E. coli* под транскрипционным контролем длинного концевого повтора ВИЧ-1. При проникновении псевдовируса в клетку-мишень TZM-bl в ответ на синтез вирусного белка Tat запускается экспрессия репортерного гена люциферазы, которая детектируется с помощью люменометра. При этом высокая интенсивность люминесценции соответствует проникновению псевдовирусных частиц в клетки-мишени, а подавление люминесценции, наоборот, указывает на нейтрализацию *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 (Platt et al., 1998; Wei et al., 2002). Общий принцип работы *env*-псевдовирусной системы представлен на рис. 2.

Env-псевдовирусная система имеет ряд неоспоримых достоинств. Во-первых, благодаря тому, что TZM-bl представляет собой стабильную перевиваемую клеточную линию, она может заменить первичные Т-клетки человека, уменьшая потребность в индивидуальных донорских клетках. Во-вторых, *env*-псевдовирусы безопасны, в отличие от изолятов вируса и ИМК, работа с которыми требует соблюдения специальных условий биобезопасности, что усложняет эксперименты и повышает их стоимость. В-третьих, белок Env на поверхности псевдовирусных частиц формирует тримерные структуры, идентичные тримерам природного вируса. Однако главное достоинство технологии псевдовирусов заключается в том, что она позволяет получать аналоги вирусных частиц различных подтипов и штаммов ВИЧ-1, тем самым обеспечивая широкий охват генетического разнообразия ВИЧ-1 (Seaman et al., 2010; Montefiori et al., 2018). Кроме того, метод нейтрализации с использованием *env*-псевдовирусов можно оптимизировать и стандартизировать (Wei et al., 2002; Seaman et al., 2010; Sarzotti-Kelsoe et al., 2014). В таблице кратко представлена сравнительная характеристика первичных изолятов и лабораторно-адаптированных штаммов ВИЧ-1, ИМК и *env*-псевдовирусов.

Важно также отметить, что на сайте Лос-Аламосской национальной лаборатории США в открытом доступе находятся протоколы и рекомендации по проведению анализа нейтрализации с использованием *env*-псевдовирусов (https://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm). Помимо этого, по программе предоставления реагентов для исследования ВИЧ/СПИДа – HIV Reagent Program, финансируемой Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний США и курируемой Американской коллекцией типовых культур, можно получить все необходимые компоненты (клеточные линии, плазмиды, моноклональные антитела) для освоения данной технологии.

Ниже приведен ряд примеров использования панелей псевдовирусов для оценки эффективности антиретровирусных препаратов и антител. Так, для доказательства противовирусной активности препарата маравирок (клинически одобренного антагониста корецептора ВИЧ-1) была использована панель из 160 *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 подтипа B и 40 *env*-псевдовирусов других подтипов ВИЧ-1 (Dorr et al., 2005). Активность ибализумаба, моноклонального антитела, которое связывается с CD4-рецептором, была показана на 116 *env*-псевдовирусах, относящихся к подтипам A, B, C, CRF01_AE (Pace et al., 2013). С помощью панелей псевдовирусов ВИЧ-1 был исследован и спектр действия bnAbs в отношении различных генетических вариантов ВИЧ-1. Так, например, широта нейтрализации для bnAb 10E8 составила 98 % и была продемонстрирована на панели, включающей 181 вариант *env*-псевдовирусов подтипов A, B, C, D, G, CRF01_AE и CRF02_AG (Huang et al., 2012); широта нейтрализации bnAb VRC01 составила 91 % и была показана на 196 *env*-псевдовирусах (Wu X. et al., 2010); широта нейтрализации bnAb VRC34.01 составила 49 % и была продемонстрирована на 179 *env*-псевдовирусах (Kong et al., 2016). Именно благодаря внедрению панелей псевдовирусов, включающих большое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1, произошел прорыв в получении и характеризации моноклональных широконейтрализующих антител.

Панели *env*-псевдовирусов активно используются для изучения гуморального иммунного ответа, индуцируемого кандидатными вакцинами против ВИЧ-1 в ходе их разработки, доклинических и клинических испытаний, так как одним из важных показателей эффективности

ВИЧ-вакцин является наличие у вакцинируемых вирус-нейтрализующих антител (Rudometov et al., 2019a; Ou et al., 2020). В качестве примера можно привести недавние работы K. Xu с коллегами, которые разработали схему вакцинации, основанную на пептиде слияния (fusion peptide, FP), ключевом структурном компоненте gp41 при проникновении ВИЧ-1. Ранее они идентифицировали антитело VRC34.01 от ВИЧ-положительного донора, которое нацелено на консервативный N-концевой участок пептида слияния ВИЧ-1. Поскольку FP представляет собой короткий линейный пептид, он имеет низкую природную иммуногенность, поэтому в качестве белка-носителя исследователи выбрали гемоцианин улитки, широко используемый в биотехнологии. Иммунизация лабораторных животных пептидом слияния, связанным с гемоцианином улитки, с последующим бустированием тримером BG505 приводила к индукции антител, широта нейтрализации которых составила 31 % и была продемонстрирована на панели, включающей 208 *env*-псевдовирусов различных подтипов ВИЧ-1 (Xu et al., 2018).

Завершая данный обзор, хотим отметить, что система псевдотипирования ВИЧ-1 толерантна к инкорпорации поверхностных белков различных оболочечных вирусов. Учитывая тот факт, что большинство лабораторных исследований и экспериментов с вирусами должны проводиться в условиях BSL-3 или BSL-4, использование технологии псевдовирусов вместо вирусов дикого типа предоставляет возможность изучать интересующий вирус различным исследовательским группам и проводить разработку противовирусных препаратов и вакцин против особо опасных патогенов. Например, с помощью системы псевдотипирования ВИЧ-1 были получены вирусные частицы, несущие поверхностные гликопротеины вируса Эбола (Mohan et al., 2015), вируса Марбург (Zhang L. et al., 2020), вируса Ласса (Zhang X. et al., 2019), коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (Zhao et al., 2013), вируса бешенства (Nie et al., 2017), вируса чикунгуньи (Wu J. et al., 2017) и вируса Нипах (Nie et al., 2019). Кроме того, на основе данной технологии активно разрабатываются псевдовирусные платформы для SARS-CoV-2 (Hu et al., 2020; Hyseni et al., 2020; Johnson et al., 2020).

Заключение

Каждая из рассмотренных выше технологий имеет свои достоинства и недостатки, и при проведении комплексных исследований все эти инструменты, несомненно, будут дополнять друг друга. Несмотря на трудоемкость применения первичных изолятов и ИМК в анализах нейтрализации, данные модели остаются бесценным инструментом для исследования биологических свойств вирусов. Однако в настоящее время основным методом оценки эффективности вакцин и противовирусных агентов (потенциальных ингибиторов проникновения) против ВИЧ-1 является технология *env*-псевдовирусов. К достоинствам псевдовирусной системы относятся безопасность, высокий уровень воспроизводимости результатов, возможность стандартизации, а также возможность работать с вирусными частицами, экспонирующими поверхностные гликопротеины множества вирусных подтипов.

Список литературы / References

Зырянова Д.П., Богачева Н.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Модели CRF63_02A6 ВИЧ-1 как инструмент для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(4):769-774. DOI 10.15789/2220-7619-MHC-1261.
[Zyryanova D.P., Bogacheva N.V., Totmenin A.V., Gashnikova N.M. HIV-1 CRF63_02A6 models as a tool for evaluating efficacy of developing antiretroviral drugs. *Infektsiya i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(4):769-774. DOI 10.15789/2220-7619-MHC-1261. (in Russian)]

Чересиз С.В., Григорьев И.В., Семёнова Е.А., Пустыльняк В.О., Власов В.В., Покровский А.Г. Псевдовирусная система для оценки активности противовирусных соединений с использованием различных культур клеток-мишеней. *Докл. АН*. 2010; 435(1):126-130.
[Cheresiz S.V., Grigoryev I.V., Semenova E.A., Pustylnyak V.O., Vlasov V.V., Pokrovsky A.G. A pseudovirus system for the testing of antiviral activity of compounds in different cell lines. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2010;435:295-298. DOI 10.1134/S1607672910060049.]

Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(4):1-23. DOI 10.1101/cshperspect.a007161.

Baalwa J., Wang S., Parrish N.F., Decker J.M., Keele B.F., Learn G.H., Yue L., Ruzagira E., Ssemwanga D., Kamali A. Molecular identification, cloning and characterization of transmitted/founder HIV-1 subtype A, D and A/D infectious molecular clones. *Virology.* 2013; 436(1):33-48. DOI 10.1016/j.virol.2012.10.009.

Chenine A.L., Merbah M., Wieczorek L., Molnar S., Mann B., Lee J., O'Sullivan A.M., Bose M., Sanders-Buell E., Kijak G.H., Herrera C., McLinden R., O'Connell R., Michael N.L., Robb M.L., Kim J.H., Polonis V.R., Tovanabutra S. Neutralization sensitivity of a novel HIV-1 CRF01_AE panel of infectious molecular clones. *J. Acquir. Immune Defic. Syndrom.* 2018;78(3):348-355. DOI 10.1097/QAI.0000000000001675.

Dorr P., Westby M., Dobbs S., Griffin P., Irvine B., Macartney M., Mori J., Rickett G., Smith-Burchnell C., Napier C., Webster R., Armour D., Price D., Stammen B., Wood A., Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(11):4721-4732. DOI 10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005.

Edmonds T.G., Ding H., Yuan X., Wei Q., Smith K.S., Conway J.A., Wieczorek L., Brown B., Polonis V., West J.T., Montefiori D.C., Kappes J.C., Ochsenbauer Ch. Replication competent molecular clones of HIV-1 expressing *Renilla* luciferase facilitate the analysis of antibody inhibition in PBMC. *Virology.* 2010;408(1):1-13. DOI 10.1016/j.virol.2010.08.028.

González N., Pérez-Olmeda M., Mateos E., Cascajero A., Alvarez A., Spijkers S., García-Pérez J., Sánchez-Palomino S., Ruiz-Mateos E., Leal M., Alcami J. A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(12):2493-2501. DOI 10.1093/jac/dkq379.

Gray G.E., Bekker L.G., Laher F., Malahleha M., Allen M., Moodie Z., Grunenberg N., Huang Yu., Grove D., Prigmore B. Vaccine efficacy of ALVAC-HIV and bivalent subtype C gp120–MF59 in adults. *New Eng. J. Med.* 2021;384(12):1089-1100. DOI 10.1056/NEJMoa2031499.

Hsu D.C., O'Connell R.J. Progress in HIV vaccine development. *Hum. Vaccines Immunother*. 2017;13(5):1018-1030. DOI 10.1080/21645515.2016.1276138.

Hu J., Gao Q., He C., Huang A., Tang N., Wang K. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Genes Dis.* 2020;7(4):551-557. DOI 10.1016/j.gendis.2020.07.006.

Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., Munir Alam S., Wang T., Yang Y., Zhang B., Migueles S.A., Wyatt R., Haynes B.F., Kwong P.D., Mascola J.R., Connors M. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature.* 2012;491(7424):406-412. DOI 10.1038/nature11544.

Hyseni I., Molesti E., Benincasa L., Piu P., Casa E., Temperton N.J., Manenti A., Montomoli E. Characterisation of SARS-CoV-2 lentiviral pseudotypes and correlation between pseudotype-based neutralisation assays and live virus-based micro neutralisation assays. *Viruses.* 2020;12(9):1-18. DOI 10.3390/v12091011.

Jackson J.B., Coombs R.W., Sannerud K., Rhame F.S., Balfour H.H., Jr. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(7):1416-1418. PMID 3165981.

Johnson M.C., Lyddon T.D., Suarez R., Salcedo B., LePique M., Graham M., Ricana C.L., Robinson C.A., Ritter D.G. Optimized pseudotyping conditions for the SARS-COV-2 spike glycoprotein. *J. Virol.* 2020;94(21):1-10. DOI 10.1128/JVI.01062-20.

Johnston E., Dupnik K.M., Gonzales M.J., Winters M.A., Rhee S.Y., Imamichi T., Shafer R.W. Panel of prototypical infectious molecular HIV-1 clones containing multiple nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *AIDS.* 2005;19(7):731-733. DOI 10.1097/01.aids.0000166098.54564.0c.

Jones L.D., Moody M.A., Thompson A.B. Innovations in HIV-1 vaccine design. *Clin. Ther*. 2020;42(3):499-514. DOI 10.1016/j.clinthera.2020.01.009.

Kim J.H., Excler J.L., Michael N.L. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu. Rev. Med.* 2015;66:423-437. DOI 10.1146/annurev-med-052912-123749.

Kong R., Xu K., Zhou T., Acharya P., Lemmin T., Liu K., Ozorowski G., Soto C., Taft J., Bailer R., Cale E.M., Chen L., Choi C.W., Chuang G., Doria-Rose N.A., Druz A., Georgiev I.S., Gorman J., Huang J., Gordon Joyce M., Louder M.K., Ma X., McKee K., O'Dell S., Pancera M., Yang Y., Blanchard S.C., Mothes W., Burton D.R., Koff W.C., Connors M., Ward A.B., Kwong P.D., Mascola J.R. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. *Science.* 2016;352(6287):828-833. DOI 10.1126/science.aae0474.

Ladinsky M.S., Gnanapragasam P.N., Yang Z., West A.P., Kay M.S., Bjorkman P.J. Electron tomography visualization of HIV-1 fusion with target cells using fusion inhibitors to trap the pre-hairpin intermediate. *eLife.* 2020;9. DOI 10.7554/eLife.58411.

Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K.M., Bilska M., Kothe D.L., Salazar-Gonzalez J.F., Wei X., Decker J.M., Hahn B.H., Montefiori D.C. Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2005;79(16):10108-10125. DOI 10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005.

Li Q., Liu Q., Huang W., Li X., Wang Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev. Med. Virol.* 2018;28(1):1-10. DOI 10.1002/rmv.1963.

Liu Y., Cao W., Sun M., Li T. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9(1):194-206. DOI 10.1080/22221751.2020.1713707.

Mascola J.R., Snyder S.W., Weislow O.S., Belay S.M., Belshe R.B., Schwartz D.H., Clements M.L., Dolin R., Graham B.S., Gorse G.J. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 1996;173(2):340-348. DOI 10.1093/infdis/173.2.340.

Mascola J.R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B.H., Haigwood N.L., Morris L., Petropoulos C.J., Polonis V.R., Sarzotti M., Montefiori D.C. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J. Virol.* 2005;79(16):10103-10107. DOI 10.1128/JVI.79.16.10103-10107.2005.

Mavian C., Coman R.M., Zhang X., Pomeroy S., Ostrov D.A., Dunn B.M., Sleasman J.W., Goodenow M.M. Molecular docking-based screening for novel inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 protease that effectively reduce the viral replication in human cells. *bioRxiv.* 2020;1-11. DOI 10.1101/2020.11.14.382895.

Mohan G.S., Ye L., Li W., Monteiro A., Lin X., Sapkota B., Pollack B.P., Compans R.W., Yang C. Less is more: Ebola virus surface glycoprotein expression levels regulate virus production and infectivity. *J. Virol.* 2015;89(2):1205-1217. DOI 10.1128/JVI.01810-14.

Montefiori D.C., Roederer M., Morris L., Seaman M.S. Neutralization tiers of HIV-1. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2018;13(2):1-9. DOI 10.1097/COH.0000000000000442.

Ng'uni T., Chasara C., Ndhlovu Z.M. Major scientific hurdles in HIV vaccine development: historical perspective and future directions. *Front. Immun.* 2020;11:1-17. DOI 10.3389/fimmu.2020.590780.

Nie J., Liu L., Wang Q., Chen R., Ning T., Liu Q., Huang W., Wang Y. Nipah pseudovirus system enables evaluation of vaccines *in vitro* and *in vivo* using non-BSL-4 facilities. *Emerg. Microbes Infect.* 2019;8(1):272-281. DOI 10.1080/22221751.2019.1571871.

Nie J., Wu X., Ma J., Cao S., Huang W., Liu Q., Li X., Li Y., Wang Y. Development of *in vitro* and *in vivo* rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1-12. DOI 10.1038/srep42769.

Ochsenbauer C., Edmonds T.G., Ding H., Keele B.F., Decker J., Salazar M.G., Salazar-Gonzalez J.F., Shattock R., Haynes B.F., Shaw G.M., Hahn B.H., Kappes J.C. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Virol*. 2012;86(5):2715-2728. DOI 10.1128/JVI.06157-11.

Ou L., Kong W.P., Chuang G.Y., Ghosh M., Gulla K., O'Dell S., Varriale J., Barefoot N., Changela A., Chao C.W., Cheng Ch., Druz A., Kong R., McKee K., Rawi R., Sarfo E., Schön A., Shaddeau A., Tsybovsky Ya., Verardi R., Wang Sh. Preclinical development of a fusion peptide conjugate as an HIV vaccine immunogen. *Sci. Rep.* 2020;10(1):1-13. DOI 10.1038/s41598-020-59711-y.

Pace C.S., Fordyce M.W., Franco D., Kao C.Y., Seaman M.S., Ho D.D. Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2013;62(1):1-9. DOI 10.1097/QAI.0b013e3182732746.

Peden K., Emerman M., Montagnier L. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology.* 1991;185:661-672. DOI 10.1016/0042-6822(91)90537-L.

Phanuphak N., Gulick R.M. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2020;15(1):4-12. DOI 10.1097/COH.0000000000000588.

Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., Chesebro B., Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 1998;72:2855-2864. DOI 10.1128/JVI.72.4.2855-2864.1998.

Polonis V.R., Brown B.K., Borges A.R., Zolla-Pazner S., Dimitrov D.S., Zhang M.Y., Barnett S.W., Ruprecht R.M., Scarlatti G., Fenyö E., Montefiori D.C., McCutchan F.E., Michael N.L. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology.* 2008;375(2):315-320. DOI 10.1016/j.virol.2008.02.007.

Princen K., Hatse S., Vermeire K., De Clercq E., Schols D. Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4+ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists. *Retrovirology.* 2004;1(1):1-13. DOI 10.1186/1742-4690-1-2.

Pugach P., Marozsan A.J., Ketas T.J., Landes E.L., Moore J.P., Kuhmann S.E. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 in-

hibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology.* 2007;361(1):212-228. DOI 10.1016/j.virol.2006.11.004.

Rudometov A.P., Chikaev A.N., Rudometova N.B., Antonets D.V., Lomzov A.A., Kaplina O.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Artificial anti-HIV-1 immunogen comprising epitopes of broadly neutralizing antibodies 2F5, 10E8, and a peptide mimic of VRC01 discontinuous epitope. *Vaccines.* 2019a;7(3):1-18. DOI 10.3390/vaccines7030083.

Rudometov A.P., Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Lomzov A.A., Kaplina O.N., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Bakulina A.Yu., Karpenko L.I. The structural and immunological properties of chimeric proteins containing HIV-1 MPER sites. *Acta Naturae.* 2019b; 11(3):56-65. DOI 10.32607/20758251-2019-11-3-56-65.

Sarzotti-Kelsoe M., Bailer R.T., Turk E., Lin C.L., Bilska M., Greene K.M., Gao H., Todd C.A., Ozaki D., Seaman M.S., Mascola J.R., Montefiori D.C. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods.* 2014;409:131-146. DOI 10.1016/j.jim.2013.11.022.

Seaman M.S., Janes H., Hawkins N., Grandpre L.E., Devoy C., Giri A., Coffey R.T., Harris L., Wood B., Daniels M.G. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2010;84(3):1439-1452. DOI 10.1128/JVI.02108-09.

Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 as a novel aspect of the immune response. *Acta Naturae.* 2015;7(4):11-21. PMID 26798488.

Stephenson K.E., Wagh K., Korber B., Barouch D.H. Vaccines and broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Annu. Rev. Immunol.* 2020;38:673-703. DOI 10.1146/annurev-immunol-080219-023629.

Su S., Rasquinha G., Du L., Wang Q., Xu W., Li W., Lu L., Jiang S. A peptide-based HIV-1 fusion inhibitor with two tail-anchors and palmitic acid exhibits substantially improved *in vitro* and *ex vivo* anti-HIV-1 activity and prolonged *in vivo* half-life. *Molecules.* 2019;24(6):1-13. DOI 10.3390/molecules24061134.

Van't Wout A.B., Schuitemaker H., Kootstra N.A. Isolation and propagation of HIV-1 on peripheral blood mononuclear cells. *Nat. Protoc*. 2008;3(3):363-370. DOI 10.1038/nprot.2008.3.

Varghese V., Mitsuya Y., Fessel W.J., Liu T.F., Melikian G.L., Katzenstein D.A., Schiffer C.A., Holmes S.P., Shafer R.W. Prototypical recombinant multi-protease-inhibitor-resistant infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(9):4290-4299. DOI 10.1128/AAC.00614-13.

Voronin Y., Chohan B., Emerman M., Overbaugh J. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are usually dominated by the major variants found in blood. *J. Virol.* 2007;81(19):10232-10241. DOI 10.1128/JVI.01035-07.

Wagstaff K.M., Headey S., Telwatte S., Tyssen D., Hearps A.C., Thomas D.R., Tachedjian G., Jans D.A. Molecular dissection of an inhibitor targeting the HIV integrase dependent preintegration complex nuclear import. *Cell. Microbiol.* 2019;21(1):1-13. DOI 10.1111/cmi.12953.

Wang Z., Hong K., Zhang J., Zhang L., Li D., Ren L., Liang H., Shao Y. Construction and characterization of highly infectious full-length molecular clones of a HIV-1 CRF07_BC isolate from Xinjiang, China. *PLoS One.* 2013;8(11):1-9. DOI 10.1371/journal.pone.0079177.

Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:1896-1905. DOI 10.1128/aac.46.6.1896-1905.2002.

Wu J., Zhao C., Liu Q., Huang W., Wang Y. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system. *Vaccine.* 2017;35(47):6387-6394. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.10.007.

Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hogerkorp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science.* 2010;329(5993):856-861. DOI 10.1126/science.1187659.

Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., Louder M.K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nat. Med.* 2018;24(6):857-867. DOI 10.1038/s41591-018-0042-6.

Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23: 337-342. DOI 10.18699/VJ19.498.

Zhang L., Lei S., Xie H., Li Q., Liu S., Liu Q., Huang W., Xiao X., Wang Y. Screening and identification of Marburg virus entry inhibitors using approved drugs. *Virol. Sin.* 2020;35:235-239. DOI 10.1007/s12250-019-00184-3.

Zhang X., Yan F., Tang K., Chen Q., Guo J., Zhu W., He S., Banadyga L., Qiu X., Guo Y. Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry. *Antiviral Res.* 2019;167:68-77. DOI 10.1016/j.antiviral.2019.03.014.

Zhao G., Du L., Ma C., Li Y., Li L., Poon V.K., Wang L., Yu F., Zheng B.J., Jiang S., Zhou Y. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV. *Virol. J.* 2013;10(1):1-8. DOI 10.1186/1743-422X-10-266.

Zyryanova D.P., Totmenin A.V., Bogacheva N.V., Gashnikova N.M. Construction and characterization of infectious molecular clones of HIV-1 CRF63_02A6. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2020;36(3):227-233. DOI 10.1089/aid.2019.0177.

ORCID ID

N.B. Rudometova orcid.org/0000-0002-1684-9071
D.N. Shcherbakov orcid.org/0000-0001-8023-4453
A.P. Rudometov orcid.org/0000-0003-2808-4309
A.A. Ilyichev orcid.org/0000-0001-5356-0843
L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-583.2020.4, РФФИ и Новосибирской области в рамках научного проекта № 19-44-543013 и государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.06.2021. После доработки 07.08.2021. Принята к публикации 09.08.2021.