

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-589>



Характеристики изолята вируса оспы обезьян, полученного от первого заболевшего в России, и его чувствительность к 7-[N-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло-[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновой кислоте

Овчинникова А.С.[✉], Одношевский Д.А., Кабанов А.С., Боднев С.А., Пьянков О.В., Оськина О.П., Сивай М.В., Беспалов А.В., Трегубчак Т.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Золин В.В., Сергеев А.А., Агафонов А.П.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Аннотация

Введение. С начала мая 2022 г. было зарегистрировано более 90 тыс. случаев заражения вирусом оспы обезьян (ВОО) в более чем 70 странах мира. Это самая крупная из зарегистрированных вспышек оспы обезьян, вышедшая за пределы Африки.

Цель работы — подтверждение первого случая оспы обезьян в России, выделение и секвенирование изолята ВОО, а также оценка его чувствительности к противооспенному препарату — 7-[N-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло-[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновой кислоте (НИОХ-14).

Материалы и методы. В работе использовали биологические материалы, полученные из поражённого участка кожи (содержимое везикул), мазка из носоглотки, мокроты и венозной крови пациента с подозрением на оспу обезьян. Заболевание подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим определением нуклеотидной последовательности вирусной ДНК методом секвенирования. Штамм ВОО из клинических образцов выделяли в культуре клеток Vero E6. Противовирусную эффективность НИОХ-14 в отношении изолята ВОО оценивали с использованием адаптированного спектрофотометрического метода.

Результаты. Диагностическое исследование биологических образцов пациента, вернувшегося из туристической поездки по европейским странам, с жалобами на кожную сыпь по всему телу выявило в них ДНК ВОО. Изолят ВОО был выделен из содержимого везикулы в культуре клеток, генетическая последовательность MPXV-pustule S45 была собрана по результатам проведения высокопроизводительного параллельного секвенирования.

Обсуждение. Эффективность противовирусного действия готовой лекарственной формы НИОХ-14 в отношении нового штамма ВОО по результатам определения 50% вирусингибирующей концентрации составила 0,02 мкг/мл, индекс селективности — > 15 000.

Заключение. В настоящем исследовании методами ПЦР в режиме реального времени, секвенирования и электронной микроскопии был выявлен и идентифицирован возбудитель оспы обезьян, из клинического образца (содержимое везикул) на культуре клеток Vero E6 был выделен изолят ВОО и, таким образом, подтверждён первый завозной случай оспы обезьян в России. Было доказано, что препарат НИОХ-14 проявляет высокую противовирусную активность *in vitro* в отношении выделенного изолята ВОО.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян, геномное секвенирование вирусов, полимеразная цепная реакция, цитопатический эффект, противовирусная активность, НИОХ-14

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациента. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 5а от 21.07.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Кабанов А.С., Боднев С.А., Пьянков О.В., Оськина О.П., Сивай М.В., Беспалов А.В., Трегубчак Т.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Золин В.В., Сергеев А.А., Агафонов А.П. Характеристики изолята вируса оспы обезьян, полученного от первого заболевшего в России, и его чувствительность к 7-[N-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло-[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновой кислоте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(6):online-first.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-589>

EDN: <https://www.elibrary.ru/yyuugtk>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-589>

Characteristics of the monkeypox virus isolate obtained from the first patient in Russia and its sensitivity to 7-[N-(4-trifluoromethylbenzoyl)-hydrazinocarbonyl]-tricyclo-[3.2.2.0^{2,4}]non-8-en-6-carboxylic acid

Alena S. Ovchinnikova[✉], Dmitrii A. Odnoshevsky, Alexey S. Kabanov, Sergey A. Bodnev, Oleg V. Pyankov, Oksana P. Os'kina, Maria V. Sivay, Andrey V. Bespalov, Tatyana V. Tregubchak, Larisa N. Shishkina, Oleg S. Taranov, Vladimir V. Zolin, Artemiy A. Sergeev, Alexander P. Agafonov
State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Abstract

Introduction. Since early May 2022, more than 90,000 cases of monkeypox virus infection have been reported in more than 70 countries around the World. This is the largest outbreak of monkeypox ever recorded outside of Africa.

The **aim** of the study is to confirm the first case of monkeypox in Russia, to isolate and sequence a new strain of monkeypox virus (MPXV), and to assess its sensitivity to the 7-[N-(4-trifluoromethylbenzoyl)-hydrazinocarbonyl]-tricyclo-[3.2.2.0^{2,4}]non-8-en-6-carboxylic acid (NIOCH-14) antipox drug.

Materials and methods. The biological materials obtained from the affected area of the skin (contents of vesicles), a nasopharyngeal smear, sputum and venous blood from a patient with suspected monkeypox were used. The disease was confirmed by PCR followed by determination of the nucleotide sequence of viral DNA by sequencing. Isolation of the new MPXV strain from clinical samples was carried out in Vero E6 cells. The antiviral effectiveness of NIOCH-14 against the new MPXV strain was assessed using an adapted spectrophotometric method.

Results. A diagnostic study of the biological samples of a patient who returned from a tourist trip to European countries with complaints of skin rashes all over the body revealed MPXV DNA. A new strain of MPXV was isolated from vesicles in Vero E6 cells, and the genomic sequence MPXV-pustule S45 was assembled using high-throughput parallel sequencing (NGS).

Discussion. The effectiveness of the finished dosage form of NIOCH-14 against the new strain of MPXV based on the results of determining the 50% virus inhibitory concentration (IC₅₀) was 0.02 µg/mL, and the selectivity index (SI) was > 15,000.

Conclusion. In this study, the pathogen of monkeypox was detected and identified using real-time PCR, NGS and electron microscopy, and the first imported case of this disease in Russia was confirmed. It has been proven that the drug NIOCH-14 exhibits high antiviral activity *in vitro* against the new MPXV strain.

Keywords: monkeypox virus, genomic sequencing of viruses, PCR, cytopathic effect, antiviral activity, NIOCH-14

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patient. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" (protocol No. 5a, July 21, 2022).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ovchinnikova A.S., Odnoshevsky D.A., Kabanov A.S., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Os'kina O.P., Sivay M.V., Bespalov A.V., Tregubchak T.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Zolin V.V., Sergeev A.A., Agafonov A.P. Characteristics of the monkeypox virus isolate obtained from the first patient in Russia and its sensitivity to 7-[N-(4-trifluoromethylbenzoyl)-hydrazinocarbonyl]-tricyclo-[3.2.2.0^{2,4}]non-8-en-6-carboxylic acid. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):online-first.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-589>

EDN: <https://www.elibrary.ru/yuugtk>

Введение

Прошло уже более 60 лет с тех пор, как был открыт возбудитель особо опасной зооантропонозной вирусной инфекции у людей — вирус оспы обезьян (ВОО), который относится к тому же роду *Orthopoxvirus* (семейство *Poxviridae*), что и вирус натуральной оспы, и обладает высокой летальностью для людей (до 17%) [1–3]. Геномное секвени-

рование ВОО показало существование двух ветвей этого вируса: клады Западной Африки и Центральной Африки (бассейна Конго), каждая из которых вызывает заболевание — оспу обезьян, однако вирус западноафриканской клады считается менее опасным [4, 5]. С момента своего открытия это заболевание было эндемичным только для Центральной и Западной Африки [6–8]. Однако с начала мая

2022 г. оспа обезьян распространилась далеко за пределы Африканского континента, что побудило Всемирную организацию здравоохранения объявить вспышку этого заболевания в 2022 г. чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение¹. В настоящее время распространение оспы обезьян в мире продолжается, зарегистрировано уже более 90 тыс. случаев заражений в более чем 70 странах по всему миру. Это самая крупная вспышка оспы обезьян из когда-либо происходивших в Африке и за её пределами.

Препараты для профилактики и лечения натуральной оспы играют важную роль в борьбе с оспой обезьян. В Европе, США, Канаде и ряде других стран одобрено новое специфическое средство для лечения оспы обезьян — препарат Tecovirimat [9], ингибитор вирусного белка VP37. Данный препарат в настоящее время широко используется для терапии этого заболевания [10], однако появились данные о выявлении устойчивых вариантов ВОО к данному препарату [11–13]. В России зарегистрирован препарат 7-[N-(4-трифторметилбензил)-гидразинокрбонил]-трицикло-[3.2.2.0^{^2,4}]нон-8-ен-6-карбоновой кислоте (НИОХ-14), обладающий аналогичным механизмом действия, что и Tecovirimat [14].

Оспа обезьян у человека больше не является редкой болезнью и представляет собой проблему общественного здравоохранения, поэтому важно иметь доступ к зарегистрированным лекарственным средствам, способным эффективно противостоять данному заболеванию.

Целью данной работы явилось подтверждение первого зарегистрированного случая ВОО в России, выделение и секвенирование изолята ВОО, а также оценка его чувствительности к отечественному противооспенному препарату НИОХ-14.

Материалы и методы

Культура клеток

В работе использовали культуру клеток Vero E6, полученную из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор». В качестве поддерживающей среды при культивировании ВОО использовали среду DMEM в присутствии 2% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл).

Пациент, образцы для тестирования

Пациент — мужчина, 28 лет, с клиническими признаками оспы обезьян, у которого для проведения работ был отобран материал с поражённой кожи (содержимое везикул), мазок из носоглотки и мокрота, венозная кровь. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациента. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 5а от 21.07.2022).

Работы с ВОО были проведены на базе лаборатории 4-го уровня биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор».

Выделение, титрование и культивирование вируса оспы обезьян

Образец с содержимым везикул перед добавлением к монослою культуры клеток Vero E6 разводили в 0,5 мл среды DMEM с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Образцы венозной крови, мазка из носоглотки и мокроты использовали без дополнительного разведения средой до внесения на клеточный монослой. Супернатант образцов, полученный после центрифугирования при 700g в течение 10 мин, добавляли по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6. Планшеты инкубировали при 37°C в условиях 5% CO₂ и ежедневно наблюдали за появлением цитопатического эффекта. Культуральную среду из лунок с разрушенным монослоем (пассаж 1) собирали и переносили во флаконы Т-25 с предварительно выращенным монослоем культуры клеток Vero E6 для последующего инкубирования при 37°C. При достижении 80% цитопатического эффекта в клеточном монослое флаконы замораживали/размораживали 3 раза, полученную вирусосодержащую суспензию осветляли путём центрифугирования при 1200g в течение 10 мин (пассаж 2). Вирусосодержащую суспензию 2-го пассажа титровали методом бляшек в 24-луночных планшетах с монослоем культуры клеток Vero E6, а также использовали для проведения экстракции вирусной ДНК и последующего её анализа с использованием высокопроизводительного секвенирования.

Получение полногеномных нуклеотидных последовательностей

ДНК ВОО выделяли из исходного материала фенол-хлороформным методом².

Концентрацию вирусной ДНК измеряли с помощью «Qubit 3.0» набором реагентов «Qubit

¹ Multi-country monkeypox outbreak: situation update. World Health Organization, June 17, 2022. URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON393>
Multi-country monkeypox outbreak: situation update. World Health Organization, June 27, 2022. URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON396>

² Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: Методические указания. М.; 2010. 51 с.

dsDNA HS Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific»), затем раствор использовали для подготовки библиотек для высокопроизводительного секвенирования на платформе «Illumina». Для подготовки библиотек использовали метод лигирования Y-образных адаптеров («Illumina»). Секвенирование проводили на секвенаторе «MiSeq» («Illumina») с использованием набора для секвенирования «MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles)» («Illumina»).

Тестирование образцов на наличие ДНК ВОО

Подтверждающее диагностическое исследование было проведено с использованием набора реагентов для выявления генетических маркеров (ДНК) ортопоксвирусов, включая ВОО, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов для выявления РНК амплификации ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины с гибридным флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-МПЦРв-Оспа» (ГНЦ ВБ «Вектор», № РЗН 2016/3685).

Тестируемый препарат, ингибитор репликации ортопоксвирусов

В работе использовали отечественный противовирусный препарат НИОХ-14, серия 010919 [14].

Метод определения противовирусной активности препарата НИОХ-14 in vitro

Оценку цитотоксичности и противовирусной эффективности препарата НИОХ-14 (серия 010919) проводили с помощью колориметрического метода [15]. В лунки 96-луночных планшетов, содержащих монослой клеток Vero E6 (~ 40 тыс. клеток в лунке), сначала вносили по 100 мкл серийных разведений растворов, приготовленных из готовой лекарственной формы препарата НИОХ-14. Затем вносили по 100 мкл разведения ВОО в дозе 800 БОЕ/лунку (множественность заражения ~ 0,02 вирусных частиц на клетку), вызывающей 100% разрушение клеток в контрольном монослое без препарата, которое происходит при инкубации клеток с вирусом через 6 сут после заражения³. Цитотоксическую активность препарата определяли по его воздействию на разрушение клеток в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контролей использовали монослой клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без препарата (контроль вируса) и монослой клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни препарат (контроль клеток).

Капсулу готовой лекарственной формы препарата НИОХ-14 вскрывали, высыпали содержимое в пенфлакон. К содержимому капсулы добавляли 10 мл диметилсульфоксида. Полученный раствор смешивали в равных объёмах с питательной средой с антибиотиком. Для оценки цитотоксичности в отношении культуры клеток Vero E6 и противовирусной активности в отношении ВОО готовили последовательные 3-кратные разведения препарата, использовали 8 разведений, начиная с концентрации 600 мкг/мл. Для оценки противовирусной активности препарата использовали 8 разведений, начиная с 2 мкг/мл.

Разведения препарата НИОХ-14 вносили в объёме 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов с культурой клеток. После инкубации при 37°C в течение 2 ч (профилактическая схема) в лунки для оценки цитотоксичности вносили по 100 мкл культуральной среды, а для оценки противовирусной активности — по 100 мкл разведения ВОО. В итоге общий объём жидкости в каждой лунке составлял 200 мкл, начальная концентрация препарата в лунках для определения цитотоксичности была 300 мкг/мл, а для определения противовирусной активности — 1,00 мкг/мл.

После 6 сут инкубирования при 37°C монослой клеток окрашивали витальным красителем нейтральным красным в течение 2 ч. После удаления красителя и отмывки лунок от его несвязавшейся фракции добавляли 0,1 мл лизирующего буфера для высвобождения красителя из поглотивших его клеток. Оптическую плотность полученного раствора, которая зависит от количества клеток в монослое, не разрушенных под влиянием препарата или вируса, измеряли с использованием планшетного спектрофотометра «Emax» («Molecular Devices») при длине волны 490 нм. С помощью программы «SoftMax 4.0» («Molecular Devices») рассчитывали 50% токсическую концентрацию (TC₅₀, мкг/мл) препарата, при которой разрушаются 50% клеток в неинфицированном монослое, и 50% вирусингибирующую концентрацию (IC₅₀, мкг/мл) препарата, при которой не разрушаются (сохраняют жизнеспособность) 50% клеток в инфицированном монослое. На основании TC₅₀ и IC₅₀ определяли индекс селективности (SI) препарата: $SI = TC_{50}/IC_{50}$.

Электронно-микроскопическое исследование

Клетки Vero E6, заражённые ВОО, были отделены с помощью резинового шпателя и зафиксированы в равном объёме 8% раствором параформальдегида в течение 1 сут. После центрифугирования (1500 об/мин, 10 мин) и трёхкратной промывки осадок дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄. Обезвоживание, пропитывание и заливку в смеси эпон-аралдит проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на ми-

³ Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е. и др. Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы. Патент 2522483 РФ (А61К 35/76 А61Р 31/12/ С12Н 7/00).

кротоме («Reichert-Jung»), окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе «JEM 1400» («Jeol»). Фотосъёмку и анализ изображения проводили с помощью цифровой камеры «Veleta» и программного пакета iTEM («SIS»).

Статистический и биоинформатический анализ данных

Данные титра ВОО представляли в виде среднего значения и его стандартного отклонения ($n = 4$).

Биоинформатический анализ последовательностей фрагментов вируса проводили при помощи пакетов MIRA v. 4.9.6, BWA v. 0.7.15, IGV v. 2.3.78, Samtools v. 1.3.1, Vcftools v. 1.62, SnpEff v. 5.2. Полногеномные последовательности выравнивали при помощи алгоритма MAFFT v. 7.505. В качестве референсной нуклеотидной последовательности был использован геном ВОО MPXV-M5312_HM12_Rivers (NC_063383.1), принадлежащий к западноафриканской кладе. Филогенетическое дерево было сконструировано при помощи метода максимального правдоподобия (IQ-TREE v. 2.1.4, модель нуклеотидных замен GTR+G+I) с использованием референтных (RefSeq) последовательностей *Orthopoxvirus* ($n = 9$). Кроме того, из базы данных GISAID были загружены все доступные к июлю 2024 г. последовательности ВОО, полученные из образцов, собранных с января 2018 г. по август 2022 г. Итоговое количество последовательностей, использованное для анализа, составило 2,289. Участки генома с пропущенными позициями в исследуемой последовательности были исключены из анализа.

Результаты

Обнаружение ВОО в клинических образцах

Исследование проводили с клиническими образцами, полученными от гражданина РФ, вернувшегося из туристической поездки по европейским странам — Испании, Португалии и др. (где на тот момент наблюдался подъём заболеваемости оспой обезьян). Через несколько дней после возвраще-

ния из-за рубежа (08.07.2022) пациент обратился в медицинское учреждение с жалобами на сыпь по всему телу. По клиническим симптомам и эпидемиологическому анализу у пациента была предположена оспа обезьян. Мазок из носоглотки и мокрота, а также содержимое везикул, собранные от больного при его поступлении в медицинское учреждение и переданные в лабораторию ГНЦ ВБ «Вектор» для исследования методом ПЦР, оказались положительными на содержание ДНК ВОО, что подтвердило диагноз оспы обезьян. В то же время в образце венозной крови пациента, также переданном для исследования, наличие ДНК ВОО не было обнаружено (таблица).

ДНК ВОО из образцов пациента была исследована с помощью высокопроизводительного секвенирования и последующего биоинформационного анализа. На основе прочтений, полученных в результате секвенирования ДНК ВОО, выделенной из клинического материала пациента, была собрана генетическая последовательность MPXV-pustule_S45 (номер последовательности в базе данных VGARus vect2SM413009). Длина полученной последовательности составила 197 203 п. н. (98,77%), средняя глубина покрытия — 11,72, число нерасшифрованных нуклеотидов — 3346. Общее количество прочтений, приходящихся на целевой геном, — 27,168.

Филогенетический анализ последовательности MPXV-pustule_S45 (рис. 1) показал, что исследуемый изолят ВОО относится к генетической кладе Ib, линии B.1. Наиболее генетически близкими к исследуемому образцу являются последовательности ВОО, выделенные в 2022 г. от пациентов из США, Перу, а также стран Западной Европы (Германии, Португалии и Ирландии).

Анализ нуклеотидных последовательностей MPXV-pustule_S45 в сравнении с референсной последовательностью NC_063383.1 ВОО показал наличие 66 нуклеотидных замен, из которых 32 замены являются миссенс-мутациями, а одна замена приводит к сдвигу рамки считывания (ген *OPG055*). Кроме того, исследованная последовательность MPXV-pustule_S45 содержит мутацию *E353K* в белке F13L (ген *OPG057*, позиция генома 39139).

Наличие ДНК ВОО в пробах, исследованных с помощью набора реагентов «Вектор-МПЦРrv-Оспа»

Presence of MPXV DNA in samples tested with the Vector-MPCR rv-Ospa reagent kit

Вид пробы Sample type	Определяемый показатель Indicator	Результаты исследования Study results
Содержимое везикул Vesicle contents	MPXV DNA	Обнаружено, Ct = 19,72 Found, Ct = 19.72
Мазок из носоглотки и мокрота Nasopharyngeal swab and sputum	MPXV DNA	Обнаружено, Ct = 16,18 Found, Ct = 16.18
Кровь из вены Venous blood	MPXV DNA	Не обнаружено, Ct > 40* Not found, Ct > 40*

Примечание. *В соответствии с инструкцией производителя при значении Ct > 40 результат анализа считается отрицательным.

Note. *According to the manufacturer's instructions, a Ct value > 40 is considered a negative test result.

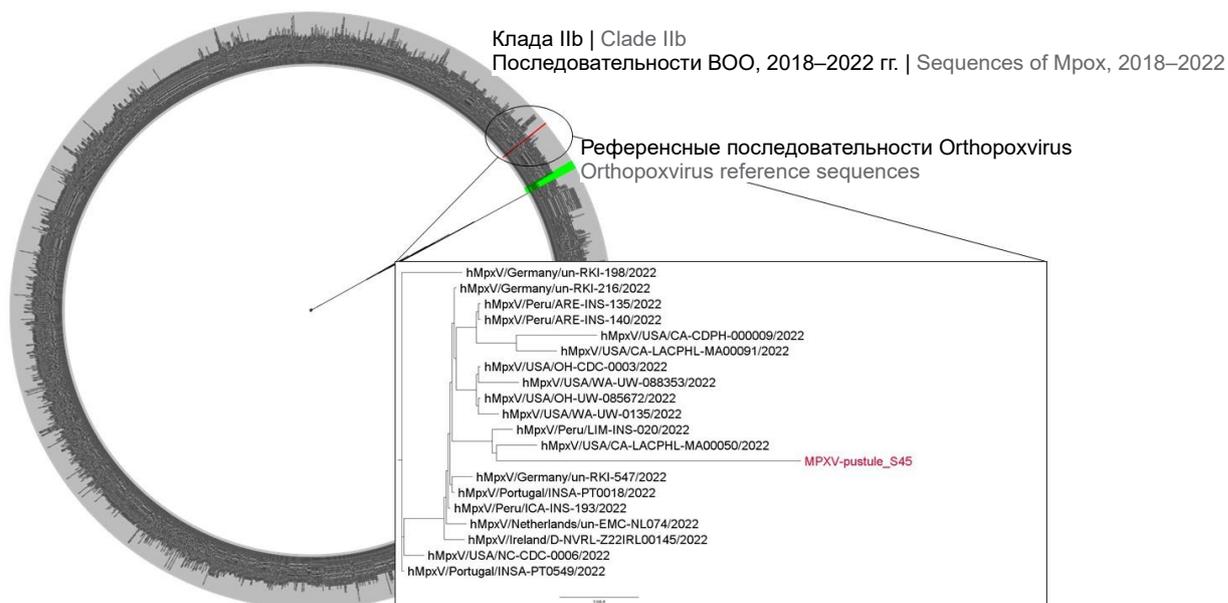


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода максимального правдоподобия.

На круговой кладограмме выделены последовательности ВОО, загруженные из GISAID. Обведено положение исследуемой последовательности MPXV-pustule_S45 и ближайших к ней последовательностей. Приведена детальная кладограмма.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method.

Mpx sequences loaded from GISAID are highlighted on the circular cladogram. The position of the investigated sequence MPXV-pustule_S45 and its closest sequences is circled. A detailed cladogram is given.

Однако мутаций, вызывающих резистентность к Tecovirimat, по результатам анализа MPXV-pustule_S45 не было выявлено.

Выделение вируса оспы обезьян в культуре клеток

Для выделения жизнеспособного ВОО из клинических образцов были использованы пробы с содержимым везикул от заболевшего человека. Через 2 дня после инокуляции клеточной культуры Vero E6 при сравнении с неинфицированной контрольной клеточной культурой наблюдали незначительное изменение морфологии клеток, которое на 5-е сутки после заражения стало проявляться в виде цитопатического действия. Были проведены 2 последовательных пассажа с целью наработки рабочего стока вируса и его депонирования в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекционных болезней и риккетсиозов, функционирующую на базе ГНЦ ВБ «Вектор», как штамм St.Petersburg-22 ВОО. Титр стока вируса в культуральной жидкости составил $5,9 \pm 0,3$ lg БОЕ/мл.

Электронно-микроскопическое исследование

Образец инфицированных штаммом St.Petersburg-22 ВОО клеток Vero E6 был исследован с использованием метода электронной микроскопии (рис. 2).

Ультраструктурный анализ инфицированных клеток показал наличие характерных для ортопоксвирусов вирусных фабрик, которые через 48 ч за-

нимали большую часть цитоплазмы инфицированной клетки Vero E6. Типичные для ортопоксвирусов вирусные частицы через 48 ч после заражения клеток Vero E6 были представлены на всех этапах цикла их формирования, при этом преобладали в основном «незрелые» вирионы. В то же время через 72 ч после заражения клеток Vero E6 преимущественно наблюдали «зрелые» вирусные частицы.

Противовирусная активность НИОХ-14 в экспериментах in vitro

Штамм ВОО St.Petersburg-22 был использован для оценки эффективности противовирусного действия препарата НИОХ-14. Результаты представлены на рис. 3.

TC_{50} для НИОХ-14 имеет величину > 300 мкг/мл (> 731 мкМ), а IC_{50} НИОХ-14 для штамма ВОО St.Petersburg-22 составляет $0,016 \pm 0,009$ мкг/мл ($0,039 \pm 0,009$ мкМ), тогда как SI был $> 18\ 750$.

Обсуждение

Вспышка оспы обезьян, которая была объявлена ВОЗ чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, с начала мая 2022 г. распространяется по всему миру, поражая преимущественно мужчин, практикующих секс с мужчинами. Случаи заболевания регистрируются в более чем 70 странах мира, создавая для общественного здравоохранения угрозу, имеющую международ-

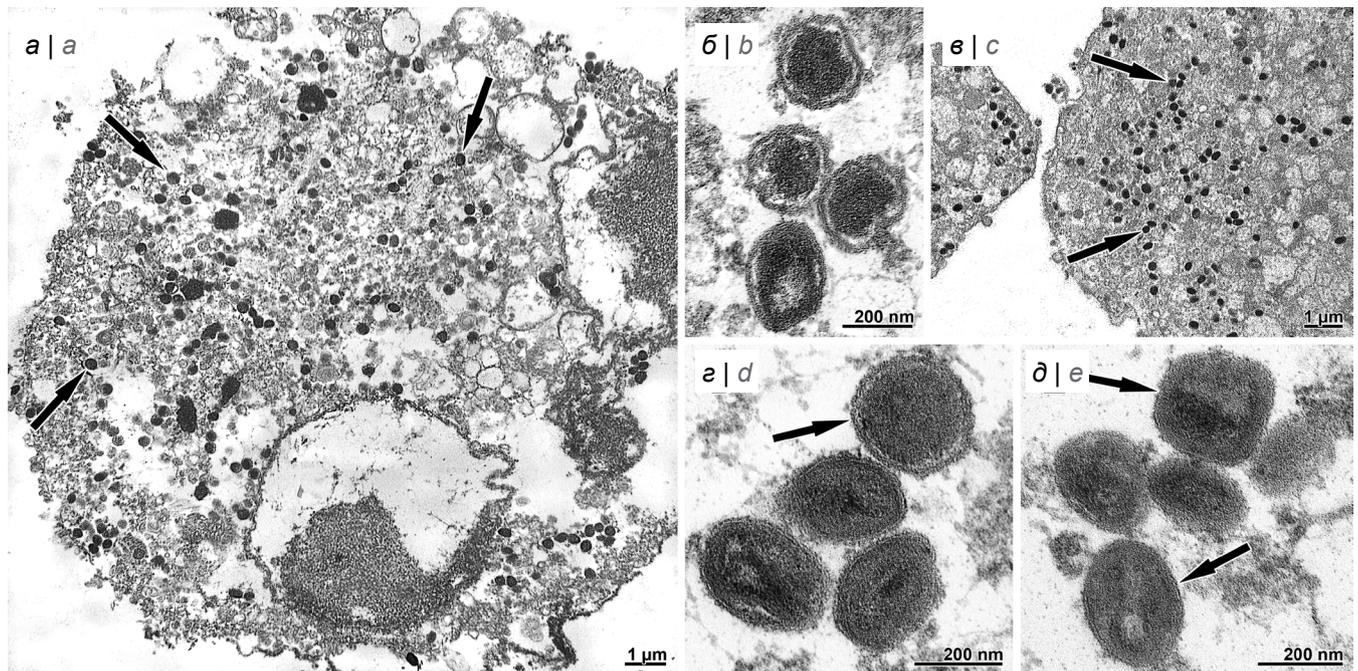


Рис. 2. Инфицированные новым штаммом St.Petersburg-22 ВОО клетки Vero E6.

а, б — 48 ч после заражения, вирусная фабрика занимает большую часть цитоплазмы клетки; вирусные частицы представлены на всех этапах цикла формирования (стрелки); преобладают «незрелые» вирионы (снимок б).

Снимки в–д — 72 ч после заражения, на снимке в преобладают «зрелые» вирусные частицы (стрелки). На снимке а стрелка указывает на «незрелую» вирусную частицу. На снимке д — типичная морфология «зрелого» вириона ортопоксвируса.

Fig. 2. Vero E6 cells infected with a new St. Petersburg-22 MPXV strain.

а, b — 48 h after infection, the viral factory occupies most of the cell cytoplasm; viral particles are represented at all stages of the formation cycle (arrows); immature virions are prevalent (image b).

Images c–e — 72 h after infection, image c shows the prevalence of mature viral particles (arrows). In image d, the arrow indicates an immature viral particle. Image e shows the typical morphology of a mature orthopoxvirus virion.

ное значение. Согласно рекомендациям ВОЗ, для проведения диагностических исследований лаборатории используют образцы из кожных поражений, фарингеальных и назофарингеальных смывов и крови⁴. При этом вирус обнаруживают чаще всего в образцах из поражений кожи и реже в крови, что, по всей видимости, связано с тем, что вирусемия происходит в очень ранний и короткий период инфекции и обычно в крови содержится меньше вируса, чем в кожных поражениях [16]. Исследование образцов (мазок из носоглотки и мокрота, содержимое везикул), полученных нами от первого зарегистрированного в России больного оспой обезьян, также позволило выявить ДНК ВОО в мазках из носоглотки, в мокроте и содержимом везикул, а выделить культуру жизнеспособного вируса — только из содержимого везикул, в то время как в образце крови вирус не обнаружен.

Анализ данных секвенирования последовательности MPXV-pustule S45 штамма ВОО St.Petersburg-22 показал его принадлежность к генетической кладе IIb, линии В.1. Показано близкое

родство генома штамма St.Petersburg-22с 19 изолятами ВОО, выявленными летом и осенью 2022 г. в различных странах.

По данным исследований известно, что заразным человек обычно становится после появления симптомов заболевания [17]. Однако недавние исследования по изучению распространения ВОО установили случаи выделения вируса пациентами, не имеющими симптомов заболевания [18]. Таким образом, заражение первого пациента в России с оспой обезьян с учётом того, что инкубационный период данного заболевания может достигать 3 нед, могло произойти в результате контакта как с больным асимптоматической формой заболевания, так и с ранее переболевшим, поскольку вирус способен ещё какое-то время после исчезновения симптомов заболевания выделяться с семенной жидкостью, ротоглоточными и аногенитальными секретами больного [19]. В пользу этого говорит и то, что контакт с больным оспой обезьян, имеющим выраженную клиническую картину заболевания, вряд ли был возможен из-за обычно ярко выраженного болевого синдрома.

Первые симптомы оспы обезьян у пациента из России установлены 06.07.2022. С учётом инкубационного периода, который может составлять

⁴ World Health Organization. Laboratory testing for the monkeypox virus. Interim guidance. URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1425052/retrieve> (дата обращения: 23.05.2022).

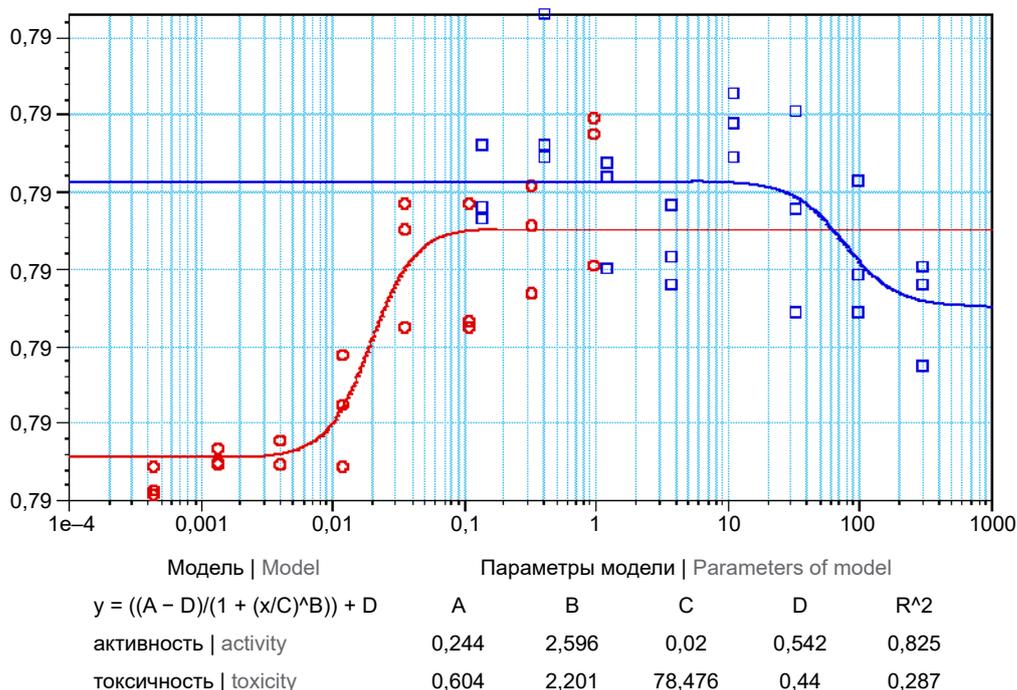


Рис. 3. Диаграмма цитотоксичности ($TC_{50} > 300$ мкг/мл) и противовирусной активности готовой лекарственной формы препарата НИОХ-14 в отношении штамма BOO St.Petersburg-22 ($IC_{50} = 0,02$ мкг/мл) в культуре клеток Vero E6 (программа «SoftMax 4.0»).

По оси абсцисс — концентрация препарата (мкг/мл) в логарифмической шкале измерения; по оси ординат — оптическая плотность (единицы оптической плотности) в линейной шкале измерения.

Fig. 3. Diagram of cytotoxicity ($TC_{50} > 300$ µg/mL) and antiviral activity of the finished dosage form of NIOCH-14 against the St.Petersburg-22 MPXV strain ($IC_{50} = 0.02$ µg/mL) in Vero E6 cell culture (SoftMax 4.0 program).

On the X-axis — drug concentration (µg/mL) in logarithmic scale of measurement; on the Y-axis — optical density (optical density units) in linear scale of measurement.

от 3 дней до 3 нед [20], вероятное его заражение произошло в период, начиная с середины июня до первых чисел июля 2022 г. По данным GISAID, среди филогенетически близких последовательностей, выявленных в данный период времени, эпидемиологически связанными с штаммом BOO St.Petersburg-22, могут быть пациенты с последовательностями hMpxV/USA/CA-CDPH-000009/2022 (определена 30.06.2024), hMpxV/Ireland/D-NVRL-Z22IRL00145/2022 (определена 17.06.2024) в случае, например, если больные были асимптоматичными, или даже с hMpxV/Portugal/INSA-PT0018/2022 (определена 01.06.2024), если заражение произошло от недавно переболевшего человека. Однако, как было указано ранее, заражение, скорее всего, произошло при контакте с бессимптомным носителем BOO. Интересно также отметить, что генетически наиболее близкие последовательности hMpxV/Peru/LIM-INS-020/2022 и hMpxV/USA/CA-LACPHL-MA00050/2022 были определены примерно в то же время, что и последовательность BOO от первого пациента в России, а именно 12 и 20 июля 2022 г. соответственно. Возможно, пациенты, от которых были получены вирусы с данными последовательностями, связаны с пациентом из России общим источником заражения.

Для выделения живой культуры BOO традиционно используют культуру клеток Vero, которая обладает высокой чувствительностью к ортопоксвирусам. При этом титры вируса при культивировании в течение 6 дней достигают уровня $5 \lg TCD_{50}/мл$ [21]. BOO, выделенный из биологических образцов, полученных от первого в России пациента с оспой обезьян, при культивировании в культуре клеток Vero достигал титра $5,9 \lg BOE/мл$ в культуральной жидкости уже через 5 сут после инфицирования клеточного монослоя. При этом ультраструктурный анализ инфицированного монослоя культуры клеток Vero E6 демонстрировал наличие характерных признаков размножения вируса в клетках и наличие вирусных частиц классического вида, характерных для BOO, схожих с выявляемой другими исследователями ультраструктурной картиной в заражённых клетках [21].

Широкое использование препарата Tecovirimat для лечения больных оспой обезьян привело к появлению информации об обнаружении вариантов BOO с лекарственной устойчивостью к данному препарату [13, 22]. Установлено, что мутации в гене *F13L*, гомологичном для ортопоксвирусов, снижают чувствительность вируса к Tecovirimat [11]. Исследование генетической структуры выделенного

нами штамма ВОО не установило наличие у него известных мутаций резистентности к Tecovirimat, а оценка чувствительности штамма к отечественному препарату НИОХ-14 показала высокую вирусингибирующую активность этого препарата, сравнимую с ранее оценённой нами для референс-штамма ВОО ($TC_{50} > 100$ мкг/мл, $IC_{50} = 0,013$ мкг/мл, $SI > 7700$) [15]. Это доказывает, что препарат НИОХ-14 обладает высокой противовирусной активностью *in vitro* в отношении выявленного у первого пациента в России штамма ВОО St.Petersburg-22.

Заключение

Использованные в настоящем исследовании подходы позволили подтвердить первый завозной случай оспы обезьян в России, выделить из биологических образцов изолят вируса и охарактеризовать культуральные и биологические свойства штамма ВОО St.Petersburg-22, депонировать штамм в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». Кроме того, исследования противооспенной активности отечественного препарата НИОХ-14 показали, что он проявляет высокую противовирусную эффективность *in vitro* в отношении первого выявленного в России штамма ВОО и может быть использован для лечения больных оспой обезьян.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Di Giulio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect. Dis.* 2004;4(1):15–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00856-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00856-9)
- Gispen R. Relevance of some poxvirus infections in monkeys to smallpox eradication. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1975;69(3):299–302. DOI: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(75\)90122-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(75)90122-4)
- Jezek Z., Szczeniowski M., Paluku K.M., Mutombo M. Human monkeypox: clinical features of 282 patients. *J. Infect. Dis.* 1987;156(2):293–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/156.2.293>
- Durski K.N., McCollum A.M., Nakazawa Y., et al. Emergence of monkeypox – West and Central Africa, 1970–2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2018;67(10):306–10. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6710a5>
- Hutin Y.J., Williams R.J., Malfait P., et al. Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. *Emerg. Infect. Dis.* 2001;7(3):434–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0703.010311>
- Learned L.A., Reynolds M.G., Wassa D.W., et al. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005;73(2):428–34. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.428>
- Reynolds M.G., Emerson G.L., Pukuta E., et al. Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;88(5):982–5. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0758>
- Sklenovská N., Van Ranst M. Emergence of monkeypox as the most important orthopoxvirus infection in humans. *Front. Public Health.* 2018;6:241. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00241>
- Grosenbach D.W., Honeychurch K., Rose E.A., et al. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(1):44–53. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1705688>
- Hermanussen L., Brehm T.T., Wolf T., et al. Tecovirimat for the treatment of severe Mpox in Germany. *Infection.* 2023;51(5):1563–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s15010-023-02049-0>
- Smith T.G., Gigante C.M., Wynn N.T., et al. Tecovirimat resistance in mpox patients, United States, 2022–2023. *Emerg. Infect. Dis.* 2023;29(12):2426–32. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2912.231146>
- Mertes H., Rezende A.M., Brosius I., et al. tecovirimat resistance in an immunocompromised patient with mpox and prolonged viral shedding. *Ann. Intern. Med.* 2023;176(8):1141–3. DOI: <https://doi.org/10.7326/123-0131>
- Garrigues J.M., Hemarajata P., Karan A., et al. Identification of tecovirimat resistance-associated mutations in human monkeypox virus – Los Angeles County. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023;67(7):e0056823. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00568-23>
- Шишкина Л.Н., Шеремет О.П., Мадонов П.Г. и др. Пероральная лекарственная форма препарата в капсулах для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами. Патент РФ №2716709;2020. Shishkina L.N., Sheremet O.P., Madonov P.G., et al. Oral dosage form of the preparation in capsules for treating and preventing Orthopoxvirus-related diseases. Patent RF № 2716709; 2020. EDN: <https://elibrary.ru/pkmxhn>
- Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е. и др. Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013;(2):54–9. Kabanov A.S., Sergeev A.A., Bulychev L.E., et al. Studies of anti-viral activity of chemically synthesized compounds against Orthopoxviruses *in vitro*. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2013;(2):54–9. EDN: <https://elibrary.ru/qbzexk>
- Álvarez Argüelles M.E., Martínez Z.P., Alba S.R., et al. Detecting, quantifying, and isolating monkeypox virus in suspected cases, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2023;29(7):1465–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2907.221229>
- Yuan S., Jiang S.C., Zhang Z.W., et al. How and when does monkeypox (mpox) transmit: Implications for prevention and treatments. *Front. Pharmacol.* 2023;13:1109928. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1109928>
- Brosius I., Van Dijck C., Coppens J., et al. Presymptomatic viral shedding in high-risk mpox contacts: A prospective cohort study. *J. Med. Virol.* 2023;95(5):e28769. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.28769>
- Suñer C., Ubals M., Tarín-Vicente E.J., et al. Viral dynamics in patients with monkeypox infection: a prospective cohort study in Spain. *Lancet Infect. Dis.* 2023;23(4):445–53. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(22\)00794-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(22)00794-0)
- Thornhill J.P., Barkati S., Walmsley S., et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 countries — April–June 2022. *N. Engl. J. Med.* 2022;387(8):679–91. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2207323>
- Miranda M.D., Caldas G.C., Ferreira V.N., et al. Monkeypox (mpox) virus isolation and ultrastructural characterisation from a Brazilian human sample case. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2023;118:e230090. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760230090>
- Lederman E.R., Davidson W., Groff H.L., et al. Progressive vaccinia: case description and laboratory-guided therapy with vaccinia immune globulin, ST-246, and CMX001. *J. Infect. Dis.* 2012;206(9):1372–85. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis510>

Информация об авторах

Овчинникова Алёна Сергеевна[✉] — к. б. н., с. н. с. отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, ovchinnikova_as@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>

Одношевский Дмитрий Александрович — н. с. отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Кабанов Алексей Сергеевич — к. б. н., с. н. с. отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Боднев Сергей Александрович — к. м. н., в. н. с. отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Пьянков Олег Викторович — к. б. н., зав. отделом «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Оськина Оксана Петровна — с. н. с. отдела биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9165-1524>

Сивай Мария Владимировна — к. б. н., с. н. с. теоретического отдела ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4193-0779>

Беспалов Андрей Витальевич — стажёр-исследователь теоретического отдела ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0281-3414>

Трегубчак Татьяна Владимировна — в. н. с. отдела геномных исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Шишкина Лариса Николаевна — д. б. н., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8264-0217>

Таранов Олег Святославович — зав. отделом микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Золин Владимир Викторович — к. м. н., зав. отделом биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4120-1178>

Сергеев Артемий Александрович — д. м. н., зам. генерального директора по научной и эпидемиологической работе ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3591-1571>

Агафонов Александр Петрович — д. б. н., генеральный директор ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Участие авторов: *Овчинникова А.С.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Одношевский Д.А.* — проведение экспериментов, подготовка текста; *Кабанов А.С., Оськина О.П.* — проведение экспериментов; *Боднев С.А.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; *Сивай М.В., Беспалов А.В.* — проведение филогенетического анализа и анализа функциональной аннотации генетических последовательностей, интерпретация данных; *Трегубчак Т.В.* — проведение экспериментов; *Пьянков О.В., Золин В.В., Шишкина Л.Н., Сергеев А.А.* — анализ и интерпретация результатов, подготовка текста, *Агафонов А.П.* — администрирование и финансирование проекта.

Статья поступила в редакцию 03.10.2024;
принята к публикации 05.12.2024;
опубликована 30.12.2024

Information about the authors

Alena S. Ovchinnikova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, ovchinnikova_as@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>

Dmitrii A. Odnoshevsky — researcher, Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Alexey S. Kabanov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Sergey A. Bodnev — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Oleg V. Pyankov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Oksana P. Os'kina — senior researcher Biosafety department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9165-1524>

Maria V. Sivay — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Theoretical department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4193-0779>

Andrey V. Bespalov — intern researcher, Theoretical department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0281-3414>

Tatyana V. Tregubchak — leading researcher, of the Department of genomic research, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Larisa N. Shishkina — D. Sci. (Biol.), Head, Department of prevention and treatment of particularly dangerous infections, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8264-0217>

Oleg S. Taranov — Head, Microscopic research department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Vladimir V. Zolin — Cand. Sci. (Med.), Head, Biosafety department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4120-1178>

Artemiy A. Sergeev — D. Sci. (Med.), Deputy Director General for scientific and epidemiological work, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3591-1571>

Alexander P. Agafonov — D. Sci. (Biol.), Director General, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Authors' contribution: *Ovchinnikova A.S.* — concept and design of research, conducting experiments, collecting, analyzing and interpreting data, preparing text; *Odnoshevsky D.A.* — conducting experiments, preparing text; *Kabanov A.S.* — conducting experiments; *Bodnev S.A.* — conducting experiments, collecting, analyzing and interpreting data; *Tregubchak T.V.* — conducting experiments; *Sivay M.V., Bespalov A.V.* — phylogenetic analysis, genome functional annotation analysis, interpretation of the results; *Pyankov O.V., Shishkina L.N., Sergeev A.A.* — analysis and interpretation of the results, preparation of the text; *Agafonov A.P.* — administration and financing of the project.

The article was submitted 03.10.2024;
accepted for publication 05.12.2024
published 30.12.2024