

НОЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Том 101
2024

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

100 ЛЕТ

ISSN 2686-7613 (Online)
ISSN 0372-9311 (Print)

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

6

NOVEMBER—DECEMBER

VOLUME 101
2024

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ЭПИДЕМИОЛОГОВ,
МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и контроля инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки);

1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки);

3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки);

3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), журнал относится к категории K1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

**ТОМ 101
2024**

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)

ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark для
поддержания контента журнала
в актуальном состоянии и информирования
читателей об изменениях в опубликованных
статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.
Переводы публикуются на сайте журнала.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**

RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's
Periodicals Directory, ROAD; EBSCO
Publishing (на платформе EBSCOhost);
ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT;
ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef;
Dimensions.

ПОДПИСКА:

ГК «Урал-пресс», индекс: 71436.
Тел.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**

<https://microbiol.crie.ru>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com/>;
<https://www.doaj.org/>;
<http://www.elsevier.com>

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов
<http://npromp.ru>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pgr.ru

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

Журнал размещает рекламу в соответствии
с ФЗ РФ от 13.03.2006 № 38-ФЗ
«О рекламе» и рекламной политикой.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов (<https://microbiol.crie.ru>).

Направляя статью в редакцию, авторы
принимают условия договора публичной
оферты (<https://microbiol.crie.ru>).

Подписано в печать 29.12.2024.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

Отпечатано в «Объединенный
полиграфический комплекс».
115114, Москва, Дербеневская
набережная, 7с2.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместители главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия
Макарова М.А., д.м.н., Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Ответственные секретари

Платонов А.Е., д.м.н., проф., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Мионов К.О., д.м.н., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Горелов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Жирнов О.П., д.б.н., проф., член-корр. РАН, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Караулов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Козлов Р.С., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

Куличенко А.Н., д.м.н., проф., академик РАН, Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Кутырев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Shubhada Vopengamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turcklab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, European Academy of Natural Sciences, R. Koch Medical Society (Germany), German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дьяков И.Н., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Мескина Е.Р., д.м.н., Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

Логунов Д.Ю., д.б.н., академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Малеев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; Белгородский государственный университет, Белгород, Россия

Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А., д.м.н., член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Тотоян А.А., д.м.н., проф., академик РАН, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Черкасов С.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

Никонова А.А., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2024

FOUNDERS:
Central Research Institute for Epidemiology
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

JOURNAL
of MICROBIOLOGY,
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY
(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

The Journal is indexed in the SCOPUS database and admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:

1.5.10. Virology (medical and biological sciences);

1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);

3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);

3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a publication included in the SCOPUS and RSCI databases.

6

NOVEMBER – DECEMBER

VOLUME 101

2024

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

The journal is an Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

Some articles are translated into English under the decision of the Editorial Board. When publishing an article in Russian and English, the translated article is placed under the same DOI on the Journal's website.

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (на платформе EBSCOhost); ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT; ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef; Dimensions.

Index for subscription to the printed version of the journal:

Ural Press: 71436.
Tel.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://microbiol.crie.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com/>;
<https://www.doaj.org/>;
<http://www.elsevier.com>

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology
www.crie.ru

Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists
<http://npopemp.ru>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pccr.ru

EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per.,
Moscow, 105064, Russia.
Tel.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://microbiol.crie.ru>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.crie.ru>).

Signed to the press on December 29, 2024.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

Printed at the Ob'yedinenny poligraficheskiy kompleks Ltd.115114, 7C2, Derbenevskaya emb., Moscow, Russian Federation.

E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, D. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editors

Tatiana A. Semenenko, Professor, D. Sci. (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Maria A. Makarova, D. Sci. (Medicine), Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Executive Secretaries

Alexander E. Platonov, Professor, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Konstantin O. Mironov, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Elena B. Brusina, RAS Corr. Member, professor, D. Sci. (Medicine), Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

Aleksandr L. Gintsburg, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexandr V. Gorelov, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Alexander N. Kulichenko, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

Roman S. Kozlov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Vladimir V. Kutryev, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Karen K. Kyuregyan, D. Sci. (Biology), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Yuri V. Lobzin, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia

Denis Yu. Logunov, RAS Full Member, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Martynovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Belgorod State University, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Yury V. Nesvizhsky, Professor, D. Sci. (Med.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Oxana A. Svitich, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Igor S. Tartakovsky, Professor, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Areg A. Totolian, RAS Full Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

Foreign members of the Editorial Board

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Shubhada Boppegamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Michael O. Favorov, PhD, D. Sci. (Medicine), DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, TurkLab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, European Academy of Natural Sciences, R. Koch Medical Society (Germany), German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, D. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, D. Sci. (Medicine), Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

EDITORIAL COUNCIL

Ilya N. Dyakov, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, D. Sci. (Medicine), Head, Department of Pediatric Infections, Department of Therapy, M.F. Vladimirovsky

Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Яцышина С.Б., Артамонова А.А., Елькина М.А., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Берсенеева А.А., Акимкин В.Г.**
Генетическая характеристика вирусов гриппа А и В, циркулировавших в России в 2019–2023 годах* 719
- Клотченко С.А., Романовская-Романько Е.А., Плотникова М.А., Пулькина А.А., Шалджян А.А., Балабашин Д.С., Топорова В.А., Алиев Т.К., Гюлиханданова Н.Е., Лиознов Д.А.**
Разработка и исследование вируснейтрализующей активности рекомбинантного человеческого антитела к F-гликопротеину респираторно-синцитиального вируса* 735
- Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Кабанов А.С., Боднеев 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* 748
- Асланов Б.И., Азаров Д.В., Макарова М.А., Марышева Е.Г., Краева Л.А., Мохов А.С., Лебедева Е.А., Гончаров Н.Е., Лебедева Н.В., Стариков Д.А., Колодживева В.В., Полев Д.Е., Гончаров А.Е.**
Патогенный потенциал орнитогенных штаммов *Escherichia coli*, выявленных в полярных регионах Земли* 758
- Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зорков И.Д., Илюхина А.А., Ковыршина А.В., Зубкова О.В., Попова О.Д., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Савина Д.М., Самохвалова Е.Г., Тухватулин А.И., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.**
Протективный потенциал структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите от COVID-19* 769
- Лиджиева А.А., Медкова А.Ю., Куликов С.В., Синяшина Л.Н., Сундюкова Р.А., Марков А.П., Вереда А.Б., Абаева Н.Е., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К., Дьяков И.Н., Каратаев Г.И.**
Клиническое исследование иммуногенности и защитной активности живой рекомбинантной вакцины «ГамЖВК» интраназального применения для профилактики коклюша у взрослых добровольцев* 779
- Репкова М.Н., Левина А.С., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф.**
Селективное подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* с помощью наноконструктов, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола* 794
- Sutriyawan A., Martini M., Sutningsih D., Agushyvana F., Wahyuningsih N.E., Adamu V.E., Akbar H., Aba M.**
Анализ временных рядов заболеваемости денге в городе Бандунг, Индонезия, с использованием модели ARIMA 803
- Marhash A.D., Nabat Z.N., Abbas N.A.**
Молекулярное обнаружение *Streptococcus agalactiae* у беременных женщин и процент вертикальной передачи их новорожденным в провинции Вавилон 812
- Наука и практика**
- Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Использование отечественного бульона**
Мюллера–Хинтона для исследования антибиотикочувствительности клинических штаммов микроорганизмов* 820

* Статья опубликована на русском и английском языках на сайте журнала: <https://www.microbiol.crie.ru>.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Yatsyshina S.B., Artamonova A.A., Elkina M.A., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Berseneva A.A., Akimkin V.G.**
Genetic characteristics of influenza A and B viruses circulating in Russia in 2019–2023* 719
- Klotchenko S.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Plotnikova M.A., Pulkina A.A., Shaldzhyan A.A., Balabashin D.S., Toporova V.A., Aliev T.K., Gyulikhandanova N.E., Lioznov D.A.**
Development and evaluation of a recombinant monoclonal human antibody with virus-neutralizing activity against the F glycoprotein of respiratory syncytial virus* 735
- Ovchinnikova A.S., Odnoshevsky D.A., Kabanov A.S., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Os'kina O.P., Sivay M.V., Bepalov 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* 748
- Aslanov B.I., Azarov D.V., Makarova M.A., Marysheva E.G., Kraeva L.A., Mokhov A.S., Lebedeva E.A., Goncharov N.E., Lebedeva N.V., Starikov D.A., Kolodzhiveva V.V., Polev D.E., Goncharov A.E.**
Pathogenic potential of ornithogenic *Escherichia coli* strains detected in the Earth's polar regions* 758
- Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Zorkov I.D., Ilyukhina A.A., Kovyrshina A.V., Zubkova O.V., Popova O.D., Ozharovskaya T.A., Zrelkin D.I., Savina D.M., Samokhvalova E.G., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.**
Protective potential of structural proteins of the SARS-CoV-2 virus in protecting against COVID-19* 769
- Lidzhieva A.A., Medkova A.Yu., Kulikov S.V., Sinyashina L.N., Sioundiukova R.A., Markov A.P., Verveda A.B., Abaeva N.E., Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Dyakov I.N., Karataev G.I.**
A clinical study of the immunogenicity and protective potency of a live recombinant GamLPV vaccine for intranasal use for the prevention of whooping cough in adult volunteers* 779
- Repkova M.N., Levina A.S., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F.**
Selective suppression of influenza A/H5N1 virus replication *in vitro* using nanocomplexes consisting of siRNA and aminopropylsilanol nanoparticles* 794
- Sutriyawan A., Martini M., Sutningsih D., Agushybana F., Wahyuningsih N.E., Adamu V.E., Akbar H., Aba M.**
Time series analysis of dengue incidence in Bandung City, Indonesia using a ARIMA model 803
- Marhash A.D., Nabat Z.N., Abbas N.A.**
Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women and percentage of vertical transmission to their neonates in Babylon province 812
- ### SCIENCE AND PRACTICE
- Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V.**
Analysis of antibiotic sensitivity of clinical strains of microorganisms with the Russian Mueller–Hinton broth* 820

* The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://www.microbiol.crie.ru>.



Генетическая характеристика вирусов гриппа А и В, циркулировавших в России в 2019–2023 годах

Яцышина С.Б.[✉], Артамонова А.А., Елькина М.А., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Берсенева А.А., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Вирусы гриппа обладают высоким потенциалом генетических изменений. Ежегодно по всему миру, в том числе в России, проводится мониторинг вирусов гриппа, чтобы определить доминирующие генетические группы и отобрать среди них штаммы, которые войдут в состав противогриппозных вакцин.

Цели исследования: анализ циркуляции вирусов гриппа в России в 2019–2023 гг., проведение филогенетического и молекулярного анализа последовательностей гемагглютинина (НА) вирусов гриппа, выявление мутаций резистентности к ингибиторам нейраминидазы (NA) и ингибиторам ионного канала M2-белка (M2).

Материалы и методы. Исследованы биологические образцы, содержащие РНК вирусов гриппа: 410 А(Н1N1)pdm09, 147 А(Н3N2) и 167 В(Виктория). Осуществляли секвенирование фрагментов сегментов НА, NA, М, проводили обработку и анализ данных.

Результаты. Исследованы нуклеотидные последовательности НА, NA, М вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В(Виктория), циркулировавших в 2019–2023 гг. Наибольшая вариабельность НА наблюдалась у вирусов А(Н3N2). Все вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 сезона 2022–2023 гг. имели не встречавшуюся ранее мутацию E224A в НА, которая увеличивает его сродство к α-2,3-сиаловым кислотам — рецепторам, локализованным в лёгких человека, с которыми связывается вирус посредством НА. У 2 и 3% вирусов А(Н1N1)pdm09 в сезонах 2019–2020 и 2022–2023 гг. соответственно в рецептор-связывающем сайте НА обнаружена мутация D222N, которая ассоциирована с более тяжёлым заболеванием. Мутация устойчивости к осельтамивиру и занамивиру H275Y в NA выявлена у 2,3% вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2022–2023 гг. Во всех исследованных вирусах гриппа А(Н3N2) и В мутации устойчивости к осельтамивиру и занамивиру в NA не обнаружены. По данным секвенирования, во всех исследованных вирусах гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) имелась мутация устойчивости к адамантанам S31N в M2.

Выводы. Обнаружение мутаций, затрагивающих антигенные и рецептор-связывающие сайты НА, а также мутаций резистентности в NA и M2 подтверждает необходимость постоянного генетического надзора за вирусами гриппа. Подавляющее большинство циркулирующих в настоящее время вирусов сохраняют чувствительность к ингибиторам NA.

Ключевые слова: вирусы гриппа, секвенирование, филогенетический анализ, молекулярно-генетический анализ

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 3 от 27.03.2020).

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам региональных управлений и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора за проведение первичных лабораторных исследований и предоставление биологического материала. Авторы выражают благодарность медицинскому технологу лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора М.А. Тихоновой за проведение лабораторных исследований.

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: Яцышина С.Б., Артамонова А.А., Елькина М.А., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Берсенева А.А., Акимкин В.Г. Генетическая характеристика вирусов гриппа А и В, циркулировавших в России в 2019–2023 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):719–734.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-480>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-480>

Genetic characteristics of influenza A and B viruses circulating in Russia in 2019–2023

Svetlana B. Yatsyshina[✉], Anna A. Artamonova, Maria A. Elkina, Anna V. Valdokhina, Victoria P. Bulanenko, Aleksandra A. Berseneva, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. Influenza viruses have a high potential for genetic change. These viruses are monitored annually around the world, including Russia, to determine the dominant genetic groups and select the strains to be included in influenza vaccines.

Objectives of the study include: analysis of influenza virus circulation in Russia in 2019–2023, phylogenetic and molecular analysis of hemagglutinin (HA) sequences of influenza viruses, detection of mutations associated with drug resistance to neuraminidase (NA) inhibitors and M2-protein (M2) ion channel inhibitors.

Materials and methods. Biological samples containing RNA of influenza viruses were studied: 410 A(H1N1)pdm09, 147 A(H3N2) and 167 B(Victoria). Sequencing of the HA, NA, M fragments was performed on the 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Data processing and analysis were carried out using DNASTAR, Nextclade, FluSurver and BioNumerics v.6.6 software.

Results. Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B(Victoria) viruses circulating in 2019–2023 were investigated. The highest variability of HA was observed in A(H3N2) viruses. All influenza A(H1N1)pdm09 viruses in the 2022–2023 season had a previously unknown mutation *E224A* in HA, which increases its affinity for α -2,3 sialic acids — receptors localized in the human lungs, to which the virus binds via HA. 2 and 3% of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in 2019–2020 and 2022–2023, respectively, had the *D222N* mutation in the receptor-binding site of HA, which is associated with more severe disease. The oseltamivir and zanamivir resistance mutation *H275Y* in NA was detected in 2.3% of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in 2022–2023. No oseltamivir and zanamivir resistance mutations in NA were detected in all tested influenza A(H3N2) and B viruses. Sequencing data revealed a mutation of adamantane resistance *S31N* in M2 in all studied influenza viruses A(H1N1)pdm09 and A(H3N2).

Conclusions. The detection of amino acid substitutions in HA antigenic sites and resistance mutations in NA and M2 confirms the evolution of influenza viruses and the necessity for continuous genetic surveillance. The vast majority of currently circulating viruses remain sensitive to NA inhibitors.

Keywords: *influenza viruses, sequencing, phylogenetic analysis, molecular genetic analysis*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute for Epidemiology (protocol No. 3, March 27, 2020).

Acknowledgement. The authors are grateful to the staff of the regional departments and centers of hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor for conducting primary laboratory tests and providing biological material. The authors are grateful to M.A. Tikhonova, medical technologist at the Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Respiratory Tract Infections of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, for conducting laboratory studies.

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: Yatsyshina S.B., Artamonova A.A., Elkina M.A., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Berseneva A.A., Akimkin V.G. Genetic characteristics of influenza A and B viruses circulating in Russia in 2019–2023. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):719–734

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-480>

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

Введение

Вирусы гриппа (*Influenza virus*) — это оболочечные вирусы семейства *Orthomyxoviridae*, которые классифицируются на 4 рода: вирусы гриппа А, В, С и D. Наибольшую опасность для здоровья человека, представляют вирусы гриппа А и В [1].

Вирусы гриппа А являются причиной большинства ежегодных эпидемий и всех периодиче-

ских пандемических заболеваний человека. Они подразделяются на подтипы в соответствии с комбинацией 2 поверхностных гликопротеинов, расположенных в липидной мембране вирионов: гемоглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). У птиц, основных естественных животных — резервуаров вирусов гриппа А, описаны 16 HA и 9 NA; ещё 2 HA и NA обнаружены у летучих мышей [2]. В настоя-

щее время вирусы гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2 вызывают наибольшее число эпидемических заболеваний у людей¹.

Вирусы гриппа В специфичны для людей (описаны также случаи у тюленей [3]) и подразделяются на 2 эволюционные линии, значительно различающиеся по антигенным свойствам (В/Виктория и В/Ямагата).

Вирусы гриппа находятся в состоянии постоянной эволюции в своих резервуарах, чему способствует высокая скорость мутаций из-за отсутствия у РНК-зависимой РНК-полимеразы механизмов коррекции ошибок в процессе репликации РНК вируса [4]. Основным резервуаром для вирусов гриппа А служат дикие перелётные птицы и другие млекопитающие, включая человека, в то время как вирусы гриппа В и С резервуара в дикой природе не имеют. Кумулятивные изменения в последовательностях, кодирующих HA и NA, приводят к антигенному дрейфу вирусов гриппа А и В: изменяется структура антигенных поверхностей, распознаваемых специфическими антителами, что способствует ежегодной эпидемии [5]. Для вирусов гриппа А также возможен антигенный сдвиг: сегменты, кодирующие HA (и в меньшей степени NA), эволюционировавшие в составе вирусов гриппа животных, могут комбинироваться с сегментами вируса гриппа человека с образованием новых штаммов — реассортантов, способных вызывать пандемии [4, 5]. С 1889 г. известны 5 пандемий вирусов гриппа А, самая серьёзная из которых была вызвана в 1918 г. подтипом H1N1, а последняя — в 2009 г. подтипом A(H1N1)pdm09 [4, 6]. Подтип H3N2 начал циркулировать с пандемии 1968 г. [7]. С 1971 г. ежегодно с большей или меньшей интенсивностью циркулируют оба подтипа вируса гриппа А — H3N2 и H1N1 (с 2009 г. — H1N1pdm09) и обе эволюционные линии вируса гриппа В.

Вирус гриппа В был идентифицирован в 1940 г. Две антигенные линии вирусов — V/Victoria/2/87-подобные (Виктория) и V/Yamagata/16/88-подобные (Ямагата) — коциркулируют с 1983 г. [8].

Вирусы гриппа В/Виктория быстрее эволюционируют с большим давлением позитивной селекции, чем вирусы линии В/Ямагата [9], при этом последние не циркулировали с марта 2020 г.: с тех пор появлялись единичные сообщения об обнаружении вирусов гриппа В/Ямагата, однако без подтверждения секвенированием HA вируса².

Под эгидой ВОЗ во всех странах мира проводится мониторинг вирусов гриппа, включая их типирование, исследование генетических характеристик и антигенных свойств, чтобы отобрать среди доминирующих антигенных групп штаммы вирусов, которые войдут в состав противогриппозных вакцин в следующем эпидемическом сезоне. Выбор вакцинных штаммов с определёнными иммуногенными свойствами необходим, чтобы обеспечивать иммунный ответ против вирусов гриппа [10]. Широкомасштабный генетический мониторинг позволяет проводить глубокую дифференцировку до клайдов и субклайдов и определять тренд эволюции вирусов гриппа: появление, распространение и исчезновение из циркуляции определённых генетических вариантов.

В ходе эволюции наиболее значимые изменения затрагивают HA вирусов гриппа. Гликопротеин HA вирусов гриппа синтезируется как единая полипептидная цепь, которая в дальнейшем подвергается протеолитическому расщеплению на 2 субъединицы: HA1 и HA2. HA1 отвечает за связывание вируса с сиаловыми кислотами (СК) на поверхности мембраны клетки, HA2 обеспечивает слияние мембран вируса и эндосомы.

Антигенные сайты, расположенные на вершине HA1 рядом с рецептор-связывающим сайтом, являются главными мишенями для нейтрализующих антител человека. Гликозилирование HA ассоциировано со многими свойствами, включая иммуногенность и специфичность к рецепторам, играет важную роль в защите антигенных сайтов от нейтрализующих антител [11]. Паттерн гликозилирования более вариабелен в HA1, чем в HA2, которая более консервативна [12].

Аминокислотные (АК) замены в рецептор-связывающем домене HA влияют на способность связываться с поверхностью клетки хозяина, что изменяет вирулентность вируса [13]. На поверхности клеток верхних дыхательных путей человека расположены СК преимущественно α -2,6-типа, тогда как в нижних дыхательных путях — α -2,3. Усиление средства вируса к α -2,3-СК может увеличивать тяжесть заболевания [14].

Эволюции вирусов гриппа В/Виктория, помимо точечных мутаций, способствуют инсерции и делеции АК HA в области связи с рецептором, которые приводят к ускользанию от иммунного ответа [15].

АК-замены в NA (вирусов гриппа А и В) и M2 (вирусов гриппа А) снижают эффективность лекарственных препаратов: ингибиторов NA (осельтамивира, занамивира) и ингибиторов ионного канала M2 — адамантанов (амантадина и римантадина). По информации центров по контролю и профилактике заболеваний США, в настоящий момент практически 100% вирусов гриппа А устойчивы к действию амантадина и римантадина [16].

¹ ВОЗ. Грипп (сезонный). URL: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

² ECDC. Influenza virus characterisation, Summary Europe, July 2021. Stockholm;2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-july-2021>; ECDC. Influenza virus characterization: summary report, Europe, July 2022. Copenhagen;2022. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterization-summary-europe-july-2022>

Цели работы — выполнить молекулярно-генетический анализ сегментов *HA*, *NA* и *M* вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и В/Виктория, циркулировавших в России в эпидемические сезоны 2019–2023 гг., определить мутации АК в *HA* по сравнению с вакцинными штаммами, их возможное влияние на антигенные свойства и силу связи со специфическими рецепторами; провести филогенетический анализ по гену *HA*, а также анализ *NA* и *M2* на наличие молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам.

Материалы и методы

Обнаружение РНК вирусов гриппа А и В в биологическом материале (мазках из носоглотки и ротоглотки, мокроте, аспиратах из трахеи, бронхоальвеолярном лаваже), полученных в результате рутинного мониторинга за вирусами гриппа, проводилось в лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора 50 субъектов Российской Федерации (Центрального, Северо-Западного, Южного, Северо-Кавказского, Приволжского, Уральского и Дальневосточного федеральных округов) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 3 от 27.03.2020). В случае неблагоприятного исхода заболевания исследовался посмертный материал (аутопаты лёгких).

Для выполнения молекулярно-генетического анализа методом секвенирования нуклеиновых кислот биологический материал поступал в Референс-центр по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей на базе Лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей ЦНИИ Эпидемиологии.

Экстракцию РНК вирусов гриппа из биологического материала и последующую реакцию обратной транскрипции проводили с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», ЦНИИ Эпидемиологии). ПЦР для подтверждения обнаружения РНК вирусов гриппа осуществляли с использованием наборов реагентов «АмплиСенс *Influenza virus A/B*», «АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*», «АмплиСенс *Influenza virus A/H1-swine-FL*», «АмплиСенс *Influenza virus B-тип-FL*» (ЦНИИ Эпидемиологии).

Для амплификации фрагментов генов *HA*, *NA*, *M* вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), *HA* и *NA* вирусов гриппа В проводили ПЦР с детекцией методом электрофореза на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология») с использованием реагентов «АмплиСенс» (ЦНИИ Эпидемиологии).

Фрагменты амплификации отдельных сегментов вирусов гриппа (*HA*, *NA*, *M*) секвенировали по методу Сэнгера в Научной группе генной инженерии и биотехнологии ЦНИИ Эпидемиологии методом «cycle sequence» с помощью набора «BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific») на секвенаторе «3500xL Genetic Analyzer» («Applied Biosystems»).

Результаты секвенирования анализировали в Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей с использованием блока программ DNASTAR (SeqMan, EditSeq, MegAlign). Полученные нуклеотидные последовательности были загружены в международную базу данных GISAID, могут быть отфильтрованы по Search patterns «CRIE». Филогенетический анализ проводили с помощью программы «BioNumerics v. 6.6» методом UPGMA. Для отслеживания АК-мутаций использовали онлайн-платформы Nextclade, FluSurver. Нумерация аминокислот приведена по соответствующему подтипу вирусов гриппа.

Результаты

Исследованы биологические образцы, содержащие РНК вирусов гриппа: 410 A(H1N1)pdm09, 147 A(H3N2) и 167 В(Виктория), циркулировавшие в эпидемических сезонах 2019–2020, 2020–2021, 2021–2022, 2022–2023 гг. В 1 образце (мазки из верхних дыхательных путей) сезона 2022–2023 гг. были одновременно обнаружены вирус гриппа A(H1N1)pdm09 и вирус гриппа В. Из рис. 1 видно, что количество исследованных вирусов гриппа в разные годы менялось, что обусловлено различной интенсивностью эпидемического процесса гриппа в разные сезоны.

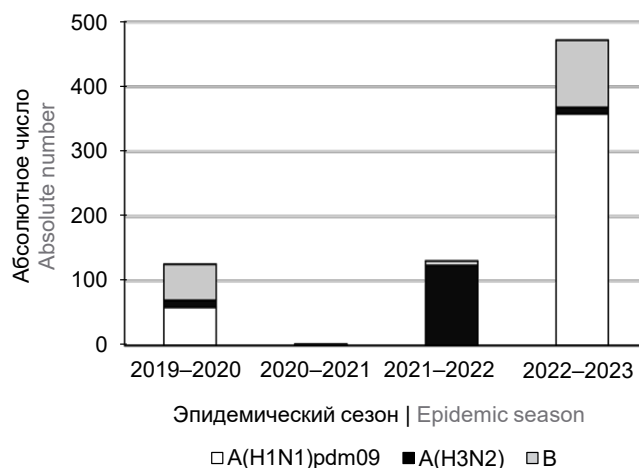


Рис. 1. Количество вирусов гриппа, исследованных в Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей в эпидемических сезонах 2019–2023 гг.

Fig. 1. Number of influenza viruses tested at the Reference center for monitoring upper and lower respiratory tract infections in 2019–2023.

Таблица 1. Количество секвенированных сегментов

Table 1. Number of sequenced segments

Вирус гриппа Influenza virus	Сегмент Segment	Количество (от выздоровевших/от умерших) Number (from the recovered/from the deceased)			
		2019–2020	2020–2021	2021–2022	2022–2023
(H1N1)pdm09	HA	59 (55/4)	–	–	351 (296/55)
	NA	59 (55/4)	–	–	87 (69/18)
	M	59 (55/4)	–	–	28 (16/2)
A(H3N2)	HA	11 (11/0)	2 (1/0)	124 (124/0)	10 (10/0)
	NA	2 (2/0)	1 (1/0)	44 (44/0)	1 (1/0)
	M	1 (1/0)	2 (1/0)	34 (34/0)	1 (1/0)
B	HA	56 (53/3)	–	7 (7/0)	104 (102/2)
	NA	35 (34/1)	–	1 (1/0)	36 (36/0)

Методом секвенирования были получены и проанализированы нуклеотидные последовательности генов *NA*, *HA*, *M* вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) и генов *NA* и *HA* вируса гриппа B (табл. 1).

Проведён филогенетический и молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа. Кластеризацию вирусов гриппа по клаждам и субклаждам проводили на основании нуклеотидных последовательностей *HA*, для сравнения использовали последовательности рекомендованных в каждом конкретном сезоне для Северного полушария вакцинных штаммов, культивированных на куриных эмбрионах, поскольку именно такие вакцины широко используются в России.

Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09

Распределение секвенированных вирусов по генетическим кластерам (клаждам, субклаждам и подгруппам) и результаты сравнения с вакцинным штаммом каждого сезона представлены в табл. 2. Гомология нуклеотидных последовательностей гена *HA* исследованных вирусов и вакцинных штаммов варьировалась в диапазоне 99,2–97,4% в зависимости от принадлежности к генетическому кла-

стеру. Наибольшие различия (до 2,6%) наблюдали в сезоне 2019–2020 гг.

По результатам секвенирования, вирусы A(H1N1)pdm09 сезона 2019–2020 гг. относились к субклажду 6B.1A.5, подгруппам 5a, 5a.1, 5a.2 и субклажду 6B.1A.7. В этом сезоне преобладали вирусы подгруппы 5a субклажда 6B.1A.5 (66%), для которой характерны АК-замены *N129D* и *T185A* в HA1. К подгруппе 6B.1A.5a.1, для которой характерны АК-замены *D187A*, *Q189E*, относились 31% исследованных вирусов. Один вирус принадлежал к подгруппе 6B.1A.5a.2 (АК-замены *N156K*, *L161I*, *V250A*), 1 вирус — к субклажду 6B.1A.7 (АК-замены *K302T* в HA1 и *I77M*, *N169S*, *E179D* в HA2).

Штамм A/Brisbane/02/2018, рекомендованный для включения в состав вакцины на эпидемический сезон 2019–2020 гг. для Северного полушария, принадлежал к субклажду 6B.1A.1.

В сезонах 2020–2021 и 2021–2022 гг. вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 в референс-центр не поступали, поскольку не циркулировали.

Все исследованные вирусы A(H1N1)pdm09 сезона 2022–2023 гг. относились к клажду 6B.1A.5a.2a, для которого характерны АК-замены *K54Q*, *A186T*, *Q189E*, *E224A*, *R259K*, *K308R*. Вакцинный штамм

Таблица 2. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей *HA* вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, поступивших в Референс-центр в 2019–2023 гг.

Table 2. Results of nucleotide sequence analysis of HA influenza A(H1N1)pdm09 viruses received by the Reference center in 2019–2023

Эпидемический сезон, годы Epidemic season	Вакцинный штамм (генетический кластер) Vaccine strain (genetic cluster)	Количество исследованных образцов Number of samples studied	Генетический кластер Genetic cluster	Гомология гена <i>HA</i> с вакцинным, % HA gene homology with the vaccine strain, %
2019–2020	A/Brisbane/02/2018 (6B.1A.1)	39	6B.1A.5a	98,4–99,2
		18	6B.1A.5a.1	98,2–98,6
		1	6B.1A.5a.2	99,2
		1	6B.1A.7	98,2
2022–2023	A/Victoria/2570/2019 (6B.1A.5a.2)	351	6B.1A.5a.2a	97,4–98,9

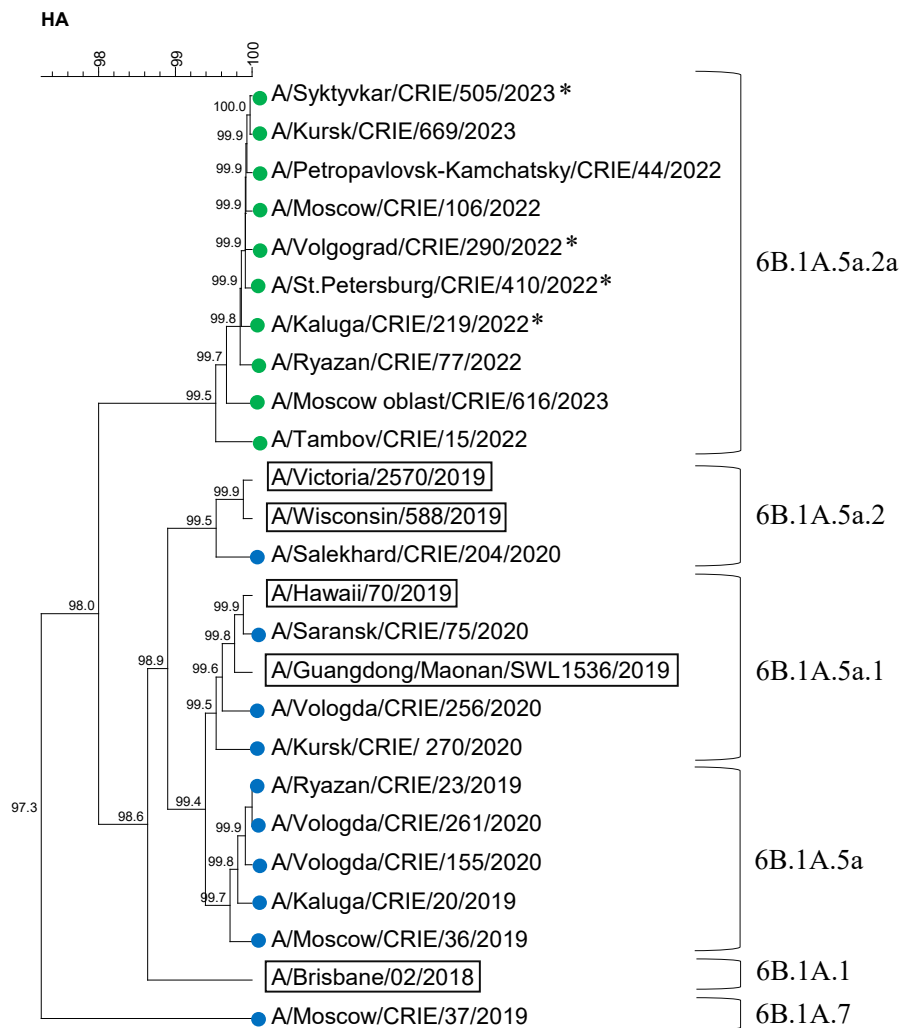


Рис. 2. Дендрограмма по гену *HA* вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 (данные Референс-центра ЦНИИ Эпидемиологии за 2019–2020, 2022–2023 гг.).

Вакцинные штаммы выделены прямоугольниками. Синими и зелёными кругами обозначены последовательности вирусов, циркулировавших в 2019–2020 и 2022–2023 гг. соответственно.

*Летальный случай.

Fig. 2. Dendrogram of the *HA* gene of influenza A(H1N1)pdm09 viruses (data of the CRIE Reference center, 2019–2020, 2022–2023).

Vaccine strains are indicated by rectangles.

Blue and green circles indicate the sequences of viruses circulating in 2019–2020 and 2022–2023 influenza seasons, respectively.

Fatal cases are marked with an asterisk.

этого сезона A/Victoria/2570/2019 причислялся к подгруппе 6B.1A.5a.2.

Результаты филогенетического анализа по гену *HA* вирусов гриппа А подтипа H1N1pdm09 в сезонах 2019–2023 гг. отражены на **рис. 2**. На дендрограмме представлена выборка секвенированных последовательностей *HA* вирусов гриппа, максимально отражающая их генетическое разнообразие.

В молекуле *HA* вируса гриппа A(H1N1)pdm09 выделяют 5 антигенных сайтов, к которым относятся следующие АК-позиции: Sa (121–122 и 150–162), Sb (184–195), Ca1 (163–167, 200–202 и 232–235), Ca2 (133–139 и 218–219), Cb (67–72) [17].

В АК-последовательности *HA* вирусов 2019–2020 гг. были обнаружены 7–12 мутаций в сравнении с вакцинным штаммом A/Brisbane/02/2018. Из них 7 находились в антигенных сайтах: Sa — *S121I/N* ($n = 2$), *N156K* ($n = 1$), *L161I* ($n = 1$), Sb — *T185I* ($n = 57$), *D187A* ($n = 18$), *Q189E* ($n = 16$), *S190N* ($n = 1$). Рядом с антигенным сайтом Ca1 обнаружена замена *R205K* ($n = 2$). Мутации *D187A* ($n = 18$), *R221K* ($n = 2$) и *D222N* ($n = 1$) находились в рецептор-связывающем сайте. Один из образцов относился к субклайду 6B.1A7 и нёс АК-замены *E68D*

(в Cb), *T120A*, *S121N* (в Sa1), *R223Q*, *K302T* (в HA1) и *I77M*, *N169S*, *E179D* (в HA2).

Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 2022–2023 гг. относительно вакцинного штамма содержали 6–12 АК-замен. Чаще обнаруживались замены *R259K*, *K54Q*, *A186T*, *Q189E*, *E224A*, *K308R/G* в HA1. Часть мутаций затрагивала антигенные сайты: Sa — *S121N* ($n = 1$), *S122L* ($n = 1$), *K154R* ($n = 1$), *G155E* ($n = 1$), *N162S* ($n = 1$, потеря сайта гликозилирования), Sb — *A186T* ($n = 351$), *D187V* ($n = 1$), *Q189E* ($n = 351$), *N194S* ($n = 1$), Ca1 — *V234I* ($n = 1$), Cb — *S69P* ($n = 1$), *L70F* ($n = 1$). Рядом с антигенными сайтами обнаружены АК-замены *N125H* ($n = 1$), *R205K* ($n = 3$). Мутации *D187V* ($n = 1$) и *D222N* ($n = 12$) находились в рецептор-связывающем сайте. У 2 образцов вирусов обнаружена мутация *D145N* в HA2, которая приводит к образованию дополнительного сайта гликозилирования.

В 2019–2020 гг. у всех вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 отсутствовали мутации, обуславливающие устойчивость к осельтамивиру и занамивиру, тогда как в 2022–2023 гг. имевшие мутацию *H275Y* в гене *NA* вирусы составили 2,3% и были обнаружены в респираторных мазках непривитых от гриппа паци-

ентов из Архангельской области в декабре 2022 г. Все вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, для которых была получена последовательность гена *M*, были устойчивы к адамантанам (мутация *S31N* в *M2*).

Вирусы гриппа A(H3N2)

Распределение исследованных вирусов гриппа A(H3N2) по генетическим кластерам и результаты сравнения с вакцинным штаммом каждого сезона представлены в **табл. 3**. Гомология нуклеотидных последовательностей гена *HA* исследованных вирусов и вакцинных штаммов варьировалась в диапазоне 99,0–95,8% в зависимости от принадлежности к генетическому кластеру. Максимальные различия (3,6–4,2%) наблюдались в сезоне 2019–2020 гг.

Вирусы гриппа A(H3N2) сезона 2019–2020 гг. были отнесены к группе 3C.2a1b, кластерам 3C.2a1b.1b и 3C.2a1b.2a. Вакцинный штамм A/Kansas/14/2017 относился к группе 3C.3a.1 (характерны АК-замены в позициях *S91N*, *N144K*, последняя приводит к потере потенциального сайта гликозилирования, *F193S* в HA1 и *D160N* в HA2). В кластер 3C.2a1b.1b, для которого характерны АК-замены в позициях *S137F*, *A138S*, *F193S* в HA1, вошли 64% образцов. К кластеру 3C.2a1b.2a с характерными АК-заменами в позициях *K83E*, *Y94N* в HA1 и *I193M* в HA2 были отнесены 36% образцов.

В молекуле HA вируса гриппа A(H3N2) к антигенным сайтам относят АК-позиции:

- А (122, 124, 126, 130–133, 135, 137, 138, 140, 142–146, 150, 152, 168);
- В (128, 129, 155–160, 163–165, 186–190, 192–194, 196–198);

- С (44–48, 50, 51, 53, 54, 273, 275, 276, 278–280, 294, 297, 299, 300, 304, 305, 307–312);
- D (96, 102, 103, 117, 121, 167, 170–177, 179, 182, 201, 203, 207–209, 212–219, 226–230, 238, 240, 242, 244, 246–248);
- Е (57, 59, 62, 63, 67, 75, 78, 80–83, 86–88, 91, 92, 94, 109, 260–262, 265) [18].

Три антигенных сайта перекрываются с рецептор-связывающим сайтом: сайт А — с петлей 130 (135, 136, 137, 138, 153); сайт В — со спиралью 190 (186, 190, 194, 195); сайт D — с петлей 220 (226 и 228) [19].

Оба вируса гриппа A(H3N2) сезона 2020–2021 гг. относились к субклайду 2a.2 подгруппы 3C.2a1b.2a.2a.2, для которой характерны АК-замены *Y159N*, *T160I* — потеря сайта гликозилирования, *L164Q*, *G186D*, *D190N* в HA1, тогда как вакцинный штамм A/Hong Kong/2671/2019 принадлежал к кластеру 3C.2a1b.1b.

В сезоне 2021–2022 гг., как и в предыдущем, все вирусы гриппа A(H3N2) относились к подгруппе 3C.2a1b.2a.2. По классификации 2022–2023 гг. вирусы были отнесены к 4 субклайдам: преобладали вирусы 3C.2a1b.2a.2a.2 (АК-замены *D53G*, *R201L*, *S219Y*), реже обнаруживались 3C.2a1b.2a.2c (АК-замены *S205F*, *A212T*), ещё реже — 3C.2a1b.2a.2 и 3C.2a1b.2a.2a.1 (АК-замены *D53G*, *D104G*, *K276R*). Вакцинный штамм A/Cambodia/e0826360/2020 относился к группе 3C.2a1b.2a, но другой генетической подгруппе 3C.2a1b.2a.1a, для которой характерны АК-замены *L157I*, *K220R*.

Вирусы гриппа A(H3N2) сезона 2022–2023 гг. принадлежали к клайду 3C.2a1b.2a.2, как и вакцинный штамм A/Darwin/9/2021, входивший в состав

Таблица 3. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей HA вирусов гриппа A(H3N2), поступивших в Референс-центр в 2019–2023 гг.

Table 3. Results of HA nucleotide sequence analysis of influenza A(H3N2) viruses received by the Reference center in 2019–2023

Эпидемический сезон, годы Epidemic season, years	Вакцинный штамм (генетический кластер) Vaccine strain (genetic cluster)	Количество исследованных образцов Number of samples studied	Генетический кластер Genetic cluster	Гомология гена <i>HA</i> с вакцинным штаммом, % HA gene homology with the vaccine strain, %
2019–2020	A/Kansas/14/2017 (3C.3a.1)	7	3C.2a1b.1b	96,2–96,4
		4	3C.2a1b.2a	95,8–96,0
2020–2021	A/Hong Kong/2671/2019 (3C.2a1b.1b, ранее previously 3C.2a1b + T135K-B)	2	3C.2a1b.2a.2a.2	97,3–97,4
2021–2022	A/Cambodia/e0826360/2020 (3C.2a1b.2a.1a)	3	3C.2a1b.2a.2	98,6–98,7
		3	3C.2a1b.2a.2a.1	98,6–98,7
		105	3C.2a1b.2a.2a.2	98,1–98,9
		13	3C.2a1b.2a.2c	98,6–98,9
		2	3C.2a1b.2a.2a	99,4
2022–2023	A/Darwin/9/2021 (2a, ранее previously 3C.2a1b.2a.2a)	2	3C.2a1b.2a.2a.1b	98,9–99,0
		3	3C.2a1b.2a.2a.3a.1	98,5–98,6
		3	3C.2a1b.2a.2b	98,5

вакцин, применяемых в Северном полушарии в 2022–2023 гг. Внутри клайда вирусы дифференцировались на субклаиды: 3 относились к 3C.2a1b.2a.2a.3a.1 (АК-замена *I140K*), 3 — к 3C.2a1b.2a.2b (характерны АК-замены *E50K*, *F79V*, *I140K*), 2 принадлежали к 3C.2a1b.2a.2a.1b (АК-замены *I140K*, *R299K*). Только 2 НА были близки вакцинному штамму A/Darwin/9/2021 (субклаид 3C.2a1b.2a.2a, для которого характерна АК-замена *H156S*).

Результаты филогенетического анализа по гену *HA* вирусов гриппа А подтипа Н3N2 представлены на **рис. 3**. В сезоне 2019–2020 гг. в АК-последова-

тельности НА вирусов были обнаружены 21–23 мутации по сравнению с вакцинным штаммом A/Kansas/14/2017, причём 19 из них находились в антигенных сайтах:

- А — *T131K* ($n = 3$), *T135K* ($n = 7$), *S137F* ($n = 7$), *I140K* ($n = 7$), *K144S* ($n = 10$);
- В — *A128T* ($n = 3$), *S159Y* ($n = 10$), *K160T* ($n = 10$), *N190D* ($n = 10$), *S193F* ($n = 3$);
- D — *N121K* ($n = 10$), *N171K* ($n = 10$), *V230I* ($n = 1$), *T246N* ($n = 10$);
- E — *E62G* ($n = 10$), *K83E* ($n = 3$), *N91S* ($n = 10$), *K92R* ($n = 10$), *Y94N/S* ($n = 3$).

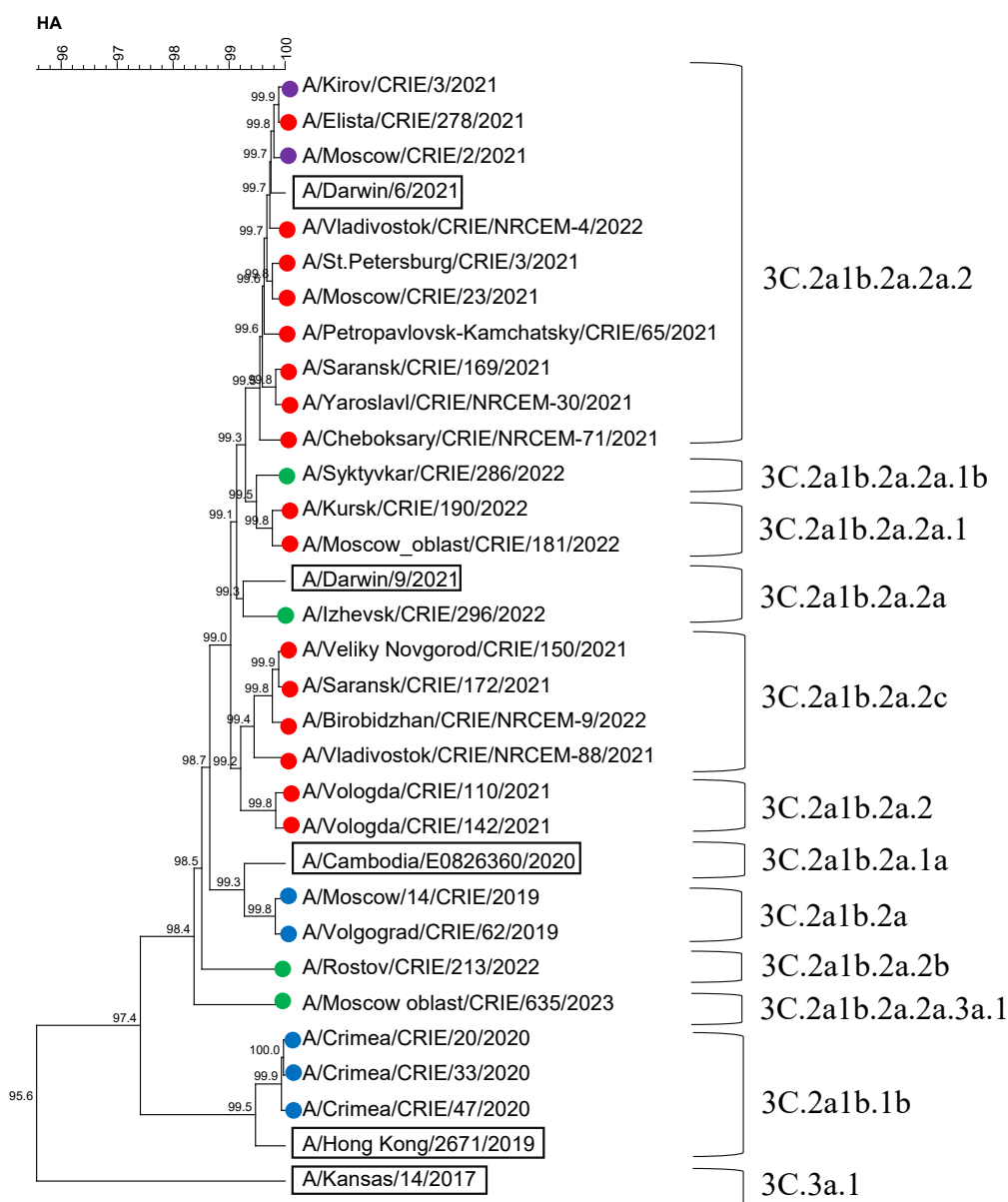


Рис. 3. Дендрограмма по гену *HA* вирусов гриппа А(Н3N2) (данные Референс-центра ЦНИИЭ за 2019–2023 гг.).

Вакцинные штаммы выделены прямоугольниками. Синими, фиолетовыми, красными и зелёными кругами обозначены последовательности вирусов, циркулировавших в 2019–2020, 2020–2021, 2021–2022 и 2022–2023 гг. соответственно. *Летальный случай.

Fig. 3. Dendrogram of the *HA* gene of influenza A(H3N2) viruses (data from the CRIE Reference center, 2019–2023).

Vaccine strains are indicated by rectangles. Blue, violet, red and green circles indicate the sequences of viruses circulating in 2019–2020, 2020–2021, 2021–2022 and 2022–2023 influenza seasons, respectively. Fatal cases are marked with an asterisk.

Три замены локализованы в рецептор-связывающем сайте: в петле 130 — *T135K*, *S137F*, в спирали 190 — *N190D*. Мутации *I77V*, *M149I* и *G155E* в HA2 содержали 11 вирусов.

Обнаружены мутации, которые приводят к появлению новых потенциальных сайтов N-гликозилирования: *A128T* (у 3 вирусов подгруппы 3С.2a1b.2a), *K160T* (у всех 10 вирусов), *T246N* (у всех 10 вирусов). У 7 вирусов подгруппы 3С.2a1b.1b имелась мутация *T135K*, которая приводит к потере сайта N-гликозилирования.

У вирусов A(H3N2), исследованных в сезоне 2020–2021 гг., в АК-последовательностях HA имелись 22–24 замены по сравнению с вакцинным штаммом A/Hong Kong/2671/2019, 16 из них находились в антигенных сайтах обоих вирусов: А — *T131K*, *K135T*, *F137S*, *S138A*; В — *A128T*, *H156S*, *Y159N*, *L164Q*, *V186D*, *D190N*; С — *D53G*; D — *R201K*, *S219Y*; Е — *K83E*, *Y94N*. У 1 вируса в сайте D была мутация *I214V*; 5 замен были локализованы в рецептор-связывающем сайте: в петле 130 — *K135T*, *F137S*, *S138A*, в спирали 190 — *V186D*, *D190N*. Дополнительно вне антигенных сайтов у обоих вирусов обнаружены мутации *N225D*, *A128T* и *K135T*, последние из которых приводят к образованию новых потенциальных сайтов N-гликозилирования.

В сезоне 2021–2022 гг. АК-последовательности HA содержали 9–12 мутаций по сравнению с вакцинным штаммом A/Cambodia/e0826360/2020.

У 124 вирусов всех субклайдов выявлены следующие замены в антигенных сайтах: В — *Y159N* (у 1 — *Y159S*), *K160I*, *L164Q*, *R186D*, *D190N*, *P198S*; D — *N171K*. Замены *R186D*, *D190N* находились в рецептор-связывающем сайте. Три вируса субклайда 3С.2a1b.2a.2 имели мутации: А — *I140K*, D — *R201I*. У 1 вируса в антигенном сайте D обнаружена мутация *S219Y*.

Три вируса субклайда 3С.2a1b.2a.2a.1 содержали мутации: С — *D53G*, *K276R*; В — *H156S*; вне антигенных сайтов — *D104G*; 105 вирусов субклайда 3С.2a1b.2a.2a.2 имели мутации в антигенном сайте D — *R201K*, *S219Y*. У 104 вирусов вне антигенных сайтов была замена *I25V*. У 4 вирусов были выявлены мутации, которые приводят к потере сайта гликозилирования: у 3 вирусов — *N122D*, у 1 — *N165K*. Тринадцать вирусов субклайда 3С.2a1b.2a.2с имели мутацию *A212T* в антигенном сайте D. У 12 вирусов вне антигенных сайтов была замена *S205F*. У 2 вирусов обнаружена мутация *S124N*, которая приводит к потере сайта гликозилирования.

В сезоне 2022–2023 гг. исследованные вирусы A(H3N2) в HA имели 2–9 АК-замен по сравнению с вакцинным штаммом A/Darwin/9/2021 и 3–9 замен по сравнению с A/Darwin/6/2021 (последовательность штамма A/Darwin/9/2021 отличается от A/Darwin/6/2021 мутацией *G53D*). 2 вируса субклайда 3С.2a1b.2a.2a имели мутацию в сайте D — *I217V*.

У 2 вирусов субклайда 3С.2a1b.2a.2a.1b были локализованы мутации в сайте А — *I140K*, С — *K276R* и *R299K*. Три вируса субклайда 3С.2a1b.2a.2a.3a.1 содержали мутации в сайте С — *E50K*, *D53N*, А — *I140K*, В — *I192F*; 3 вируса субклайда 3С.2a1b.2a.2b имели мутации *E50K* в сайте С и *I140K* в сайте А. У 2 вирусов имелась АК-замена *N96S* в HA1, приводящая к появлению сайта N-гликозилирования, у 1 мутация *N122D* в HA1 приводила к потере сайта N-гликозилирования.

В NA исследованных вирусов гриппа A(H3N2) сезонов 2019–2023 гг. мутаций резистентности к осельтамивиру и занамивиру не обнаружено, во время как все имели мутацию устойчивости к адамантанам *S31N* в M2.

Вирусы гриппа В

Все поступившие на исследование в 2019–2023 гг. вирусы гриппа В принадлежали к линии В/Виктория (по результатам ПЦР и секвенирования).

Распределение исследованных вирусов гриппа A(H3N2) по генетическим кластерам и результаты сравнения с вакцинным штаммом каждого сезона представлены в табл. 4. Гомология нуклеотидных последовательностей гена HA исследованных вирусов и вакцинных штаммов варьировала в диапазоне 99,7–98,2% в зависимости от принадлежности к генетическому кластеру. Максимальное сходство (99,0–99,7%) наблюдалось в сезоне 2022–2023 гг.

В сезоне 2019–2020 гг. 98% вирусов гриппа В относились к линии Виктория субклайду V1A.3 (1A(Δ3)B), для которого характерны тройная делеция АК-остатков 162–164 и АК-замены *K136E*, *G133R* в HA, остальные принадлежали к подгруппе V1A.3a.1, для которой характерны АК-замены в HA1 *V117I*, *V220M*. Вакцинный штамм на эпидемический сезон 2019–2020 гг. для Северного полушария В/Colorado/06/2017 относился к субклайду V1A.1 (1A(Δ2)B) линии Виктория, для которого характерны двойная делеция АК-остатков 162–163 и АК-замен в позициях *D129G*, *I180V* в HA1, *R151K* в HA2.

В сезоне 2021–2022 гг. 7 вирусов гриппа В принадлежали к линии Виктория субклайду V1A.3, подгруппе V1A.3a.2 (характерны АК-замены в позициях HA1 *A127T*, *P144L*, *K203R*). Вакцинный штамм В/Washington/02/2019, входивший в вакцины для Северного полушария в 2021–2022 гг., относился к линии Виктория субклайду V1A.3.

В сезоне 2022–2023 гг. все вирусы гриппа В относились к линии Виктория подгруппе V.1A.3a.2. Вакцинный штамм В/Austria/1359417/2021, входивший в вакцины в России в 2022–2023 гг., также принадлежал к линии Виктория подгруппе V.1A.3a.2. Результаты филогенетического анализа по гену HA вирусов гриппа В линии Виктория представлены на рис. 4.

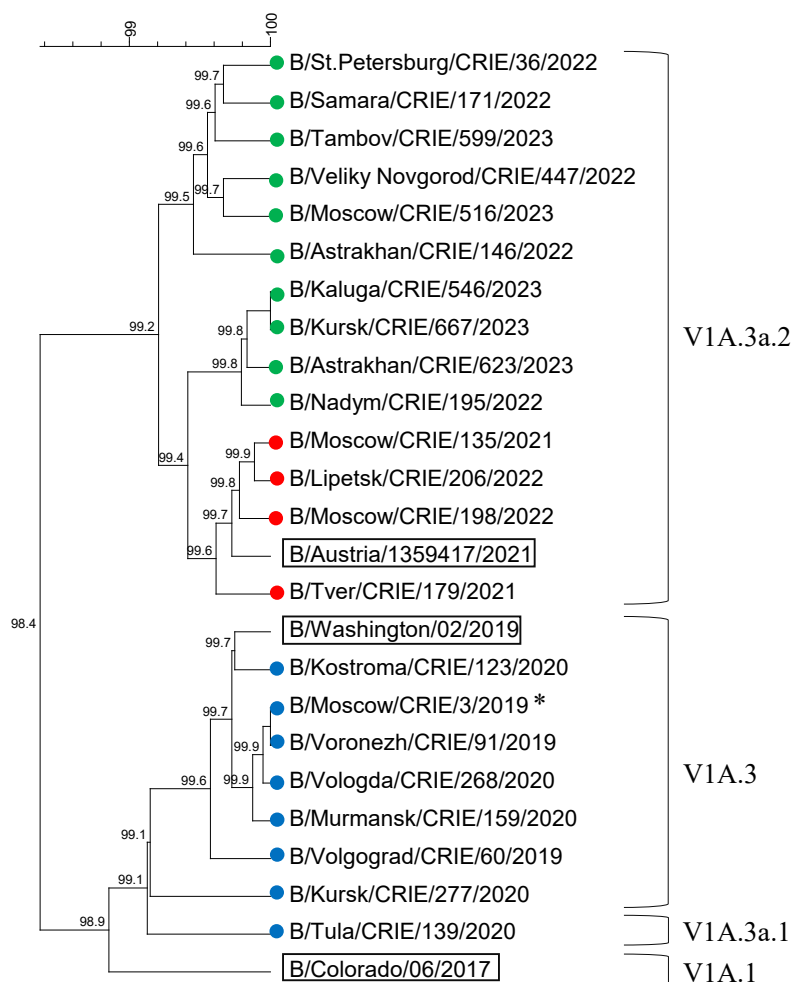
Таблица 4. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей HA вирусов гриппа В/Виктория, поступивших в Референс-центр в 2019–2023 гг.**Table 4.** Results of HA nucleotide sequence analysis of influenza B viruses of the Victoria lineage received by the Reference center in 2019–2023

Эпидемический сезон, годы Epidemic season, years	Вакцинный штамм (генетический кластер) Vaccine strain (genetic cluster)	Количество исследованных образцов Number of samples studied	Генетический кластер Genetic cluster	Гомология гена HA с вакцинным штаммом, % HA gene homology with the vaccine strain, %
2019–2020	B/Colorado/06/2017 (V1A.1, ранее previously 1A(Δ2)B)	55	V1A.3	98,2–98,8
		1	V1A.3a.1	98,6
2021–2022	B/Washington/02/2019 (V1A.3, ранее previously 1A(Δ3)B)	7	V1A.3a.2	98,2–98,7
2022–2023	B/Austria/1359417/2021 (V1A.3a.2)	104	V1A.3a.2	99,0–99,7

В молекуле HA вируса гриппа В выделяют 4 антигенных сайта: петля 120 и прилегающие регионы (116–137), петля 150 (141–150), петля 160 (162–167), спираль 190 и окружающие её области (194–202) [20]. Рецептор-связывающий сайт сформирован спиралью 190 (193–202), петлёй 240 (237–242), петлёй 140 (136–143) [21].

В сезоне 2019–2020 гг. АК-последовательности HA вирусов имели 8–12 мутаций по сравнению с вакцинным штаммом B/Colorado/06/2017, в

том числе все — дополнительную делецию АК в позиции 164. В антигенных сайтах находились 11 замен: в петле 120 — *I117V* ($n = 2$), *R118K* ($n = 2$), *N126K* ($n = 5$), *A127T* ($n = 1$), *E128K* ($n = 1$), *D129N* ($n = 55$), *G133R* ($n = 50$), *Y135D* ($n = 1$), *K136E* ($n = 56$); в петле 160 — *N166D* ($n = 1$); в спирали 190 — *N197D* ($n = 1$). Три замены находились в рецептор-связывающем сайте: в спирали 190 — *N197D*; в петле 240 — *P241Q* ($n = 1$); в петле 140 — *K136E*. По 1 вирусу имели замены *N166D*, *N197D* и *N233S*,

**Рис. 4.** Дендрограмма по гену HA вирусов гриппа В/Виктория.

Данные Референс-центра ЦНИИ Эпидемиологии за 2019–2020, 2020–2021 и 2022–2023 гг. Вакцинные штаммы выделены прямоугольниками. Синими, красными и зелёными кругами обозначены последовательности вирусов, циркулировавших в 2019–2020, 2021–2022 и 2022–2023 гг. соответственно. *Летальный случай.

Fig. 4. Dendrogram of the HA gene of influenza B viruses of the Victoria lineage.

Data from the CRIE Reference center, 2019–2020, 2020–2021, 2022–2023. Vaccine strains are indicated by rectangles. Blue, red and green circles indicate the sequences of viruses circulating in 2019–2020, 2021–2022 and 2022–2023 influenza seasons, respectively. Fatal cases are marked with an asterisk.

которые приводят к потере сайта гликозилирования.

В сезоне 2021–2022 гг. вирусы гриппа В имели 8–9 АК-замен в НА по сравнению с вакцинным штаммом В/Washington/02/2019. АК-замены находились в 5 позициях антигенных сайтов: в петле 120 — *A127T* ($n = 7$), *R133G* ($n = 7$); в петле 150 — *P144L* ($n = 7$), *N150K* ($n = 7$); в спирали 190 — *N197D/E* ($n = 7$). Одна замена находилась в рецептор-связывающем сайте, в спирали 190 — *N197D/E*. Мутации *N197D* у 6 вирусов и *N197E* у 1 вируса приводят к потере сайта гликозилирования.

В НА вирусов гриппа В в сезоне 2022–2023 гг. имелись 1–6 мутаций по сравнению с вакцинным штаммом В/Austria/1359417/2021. Семь замен находились в антигенных сайтах: в петле 120 — *T121N* ($n = 25$), *H122N* ($n = 3$), *E128K* ($n = 67$), в петле 150 — *G149E* ($n = 1$), в спирали 190 — *D197E* ($n = 40$), *T199A/I* ($n = 100$). Две замены находились в рецептор-связывающем сайте, в спирали 190 — *D197E*, *T199A/I*. У 1 вируса в НА2 обнаружена замена *T196I*, которая привела к потере сайта гликозилирования.

В исследованных вирусах гриппа В сезонов 2019–2023 гг. мутации в гене *NA*, снижающие чувствительность к осельтамивиру и занамивиру, не обнаружены.

Обсуждение

Этиологическая структура гриппа в разные эпидемические сезоны в России и в мире в целом варьировалась. Поступавшие на исследование в Референс-центр образцы, содержащие вирусы гриппа, были отобраны в регионах России при скрининге больных случайным образом, поэтому можно считать, что их спектр и генетические характеристики отражают общие закономерности по стране и позволяют судить о структуре гриппа и генетическом разнообразии циркулировавших вирусов в России.

В сезоне 2019–2020 гг. в Референс-центр поступали в основном вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 и В: 46,8% вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, 8,7% вирусов гриппа А(H3N2), 44,5% вирусов гриппа В/Виктория. По данным Национального центра по гриппу ВОЗ, в России в этом сезоне присутствовали в популяции все 3 подтипа гриппа, при этом преобладал вирус гриппа В/Виктория (43,7%) [22]. По данным Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (ECDC), в европейском регионе среди вирусов, которые были типированы, обнаружены 51% А(H1N1)pdm09, 40,1% А(H3N2), 8,7% В/Виктория, 0,2% В/Ямагата³. Второе место по численности занимали вирусы А(H3N2), а не вирусы

гриппа В/Виктория, как в России, что может быть связано с различным характером распространения данных типов вирусов в разных странах.

В сезоне 2020–2021 гг. в Референс-центре было исследовано только 2 вируса гриппа (А(H3N2)). По данным Национального центра по гриппу ВОЗ, в России при скрининге методом ПЦР-диагностики гриппа за весь сезон обнаружено всего 37 положительных материалов, а выделить в культуре и антигенно охарактеризовать удалось только 2 вируса гриппа В/Виктория [22]. В европейском регионе в этом сезоне также было отмечено снижение числа детектированных случаев гриппа на 99,4% по сравнению с сезоном 2019–2020 гг. Вирусы гриппа были распределены следующим образом: 14,2% А(H1N1)pdm09, 80,6% А(H3N2), 4,9% В/Виктория, 0,3% В/Ямагата [9], т. е. так же, как в России, преобладал вирус А(H3N2).

Низкая активность вирусов гриппа по всему миру была вызвана появлением нового бетакоронавируса SARS-CoV-2 в декабре 2019 г. в Китае и последующими ответными ограничительными мерами [23]. К ним относились ограничения передвижения людей: закрытие границ стран, приостановление полётов международных рейсов, карантин для пребывающих в страну и изоляция заболевших. Кроме того проводился контроль выполнения правил личной гигиены (частая обработка рук, использование дезинфицирующих средств, средств индивидуальной защиты), что способствовало снижению передачи вирусов гриппа. Сроки принятия этих мер напрямую коррелируют с резким падением заболеваемости гриппом в 2020–2021 гг.

В сезоне 2021–2022 гг. количество исследованных в Референс-центре вирусов гриппа А(H3N2) увеличилось, превалировал вирус гриппа А(H3N2) (94,7%), вирусы гриппа В составили 5,3%. Образцы, содержащие вирус гриппа А(H1N1)pdm09, не поступали. По данным Национального центра по гриппу ВОЗ, в России обнаруживался преимущественно подтип А(H3N2) с незначительным участием гриппа В/Виктория при полном отсутствии вируса А(H1N1)pdm09 [21]. Таким образом, этиологическая структура гриппа в этом сезоне в России была представлена вирусом гриппа А(H3N2) с незначительным вкладом вируса гриппа В.

По данным ECDC, в европейском регионе также преобладал вирус гриппа А(H3N2), гораздо реже обнаруживались А(H1N1)pdm09 (8,7%) и В: А(H3N2) — 90,9%, В/Виктория — 0,4%, В-Ямагата — < 0,1%⁴. Следует отметить, что несмотря на сообщения о единичных находках вирусов гриппа

³ ECDC. Influenza virus characterisation, summary Europe, July 2020. Stockholm; 2020. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-july-2020>

⁴ ECDC. Influenza virus characterisation, Summary Europe, July 2021. Stockholm; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-july-2021>

В/Ямагата, в доступных базах данных генетической информации не представлены нуклеотидные последовательности НА вирусов гриппа В/Ямагата, обнаруженные после марта 2020 г., а значит, их принадлежность к линии Ямагата не была подтверждена секвенированием.

Спектр исследованных в сезоне 2022–2023 гг. в Референс-центре вирусов гриппа выглядел следующим образом: 75,5% вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, 2,1% вирусов гриппа А(Н3N2), 22,4% вирусов гриппа В/Виктория. Среди поступивших и исследованных вирусов 12%, преимущественно гриппа А(Н1N1)pdm09 и в меньшей степени гриппа В/Виктория составили вирусы, обнаруженные в аутопсийном материале, что свидетельствовало об увеличении тяжести заболевания гриппом в сравнении с сезоном 2021–2022 гг., когда превалировал вирус гриппа А(Н3N2) и аутопсийный материал не поступал (табл. 1). Увеличение числа летальных исходов при гриппе в сезоны активной циркуляции вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 можно объяснить большим сродством этого подтипа вируса гриппа А к α -2,3-СК, что облегчает его распространение в лёгких и чаще приводит к развитию пневмонии. Кроме того, более тяжёлой эпидемии мог способствовать низкий уровень иммунитета населения из-за отсутствия контакта с вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 в течение сезонов 2020–2021 и 2021–2022 гг.

По данным Национального центра по гриппу ВОЗ, в целом по России на пике эпидемического подъёма гриппа и острых респираторных вирусных заболеваний вирусы гриппа обнаруживались в 30% образцов больных, исследованных при скрининге методом ПЦР, при этом превалировал подтип А(Н1N1)pdm09⁵. В сезоне 2022–2023 гг., по данным ECDC, в европейском регионе структура гриппа отличалась от таковой в России: 47,3% А(Н1N1)pdm09, 47,9% А(Н3N2), 4,8% В/Виктория, 0% В/Ямагата⁶, что могло быть связано с различным характером распространения данных типов вирусов в разных странах.

Полученные нами данные распределения вирусов А(Н1N1)pdm09 по генетическим группам совпали с данными НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева: в сезоне 2019–2020 гг. преобладала генетическая подгруппа 6В.1А5 (референс-штамм А/Норвегия/3433/2018)⁷, в сезоне 2022–2023 гг. —

генетическая подгруппа 6В.1А.5а.2 (референс-вирус А/Сидней/5/2021)⁸.

Значение обнаруженных мутаций, приводящих к АК-заменам, оценивали по данным литературы, подтверждённым экспериментально. При этом нужно учитывать, что разные аминокислоты отличаются по физико-химическим свойствам (неполярные, полярные заряженные и незаряженные), они могут по-разному изменять пространственную конфигурацию белка, даже если замена произошла в том же положении АК-цепи. Функциональное значение каждой мутации должно быть доказано экспериментально. В ряде случаев допустимо проводить аналогию, например, между НА подтипов Н1 и Н5, поскольку НА вирусов гриппа А Н1 и Н5 относятся к одной группе (Н1/Н2/Н5/Н6/Н11/Н13), которые, по предсказанной АК-последовательности НА, могут иметь схожие пространственные конформационные структуры НА [25].

В антигенном сайте Sa вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 были обнаружены мутации *N156K* и *L161I*, обе у 1 вируса. Мутация *S159N* в НА вируса гриппа А(Н5N1) (положение эквивалентно *N156K* в исследованных А(Н1N1)pdm09) приводит к усилению связывания с α -2,6-СК слизистой респираторного тракта хорьков [26]. Для мутации *N156K* в А(Н1N1)pdm09 было предсказано изменение антигенных свойств в эксперименте на хорьках [27].

В антигенном сайте Sb вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 обнаружены мутации *T185I*, *D187A*, *Q189E*, *S190N*. В НА вируса гриппа А(Н1N1) замена *D187A* (190 по нумерации Н3) приводит к снижению связывания с α -2,6- и увеличению сродства к α -2,3-СК [28]. В НА эпидемического вируса гриппа А(Н1N1) замена *S190N* (193 по нумерации Н3) изменяет конформацию антигенного сайта Sb [29]. Рядом с антигенным сайтом Ca1 вируса А(Н1N1)pdm09 обнаружена мутация *R205K*. В НА вируса *H5N1* замена *N224K* (по нумерации Н3) в эквивалентном положении приводит к усилению связывания с α -2,6-СК [30].

Рядом с антигенным сайтом Ca2 вируса А(Н1N1)pdm09 обнаружена мутация *R221K*, входящая в состав рецептор-связывающего сайта НА А(Н1N1)pdm09. Показано, что изменения этой аминокислоты могут влиять на антигенные свойства вирусов [31].

Аминокислота аргинин (R) в положении 223 усиливает сродство А(Н1N1)pdm09 к рецепторам птичьего типа (α -2,3-СК). Учитывая тот факт, что α -2,3-СК входят в состав гликокаликса клеток эпителия, выстилающего альвеолы лёгких человека, такие мутантные штаммы могут вызывать пнев-

⁵ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2023 года. URL: https://influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2023&week=39

⁶ ECDC. Influenza virus characterization: summary report, Europe, February 2023. Copenhagen–Stockholm;2023. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterization-summary-europe-february-2023>

⁷ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2020 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2020&week=39

⁸ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2023 года. URL: https://influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2023&week=39

монию и далее генерализованный воспалительный процесс. К 2020 г. большинство циркулирующих вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 (99,80%) имели мутацию *R223Q*, в том числе все секвенированные нами вирусы, тогда как на ранней стадии пандемии 2009 г. в составе второстепенной популяции ещё циркулировали штаммы, имеющие аргинин (R) в этом положении [32]. По-видимому, элиминация мутаций, которые могут снижать распространение вирусов в связи с высокой опасностью таких штаммов для жизни хозяина, является одним из механизмов эволюции вирусов гриппа.

Вне антигенных сайтов у 2 вирусов подтипа А(H1N1)pdm09 была обнаружена мутация *D94N*, у 1 — *D94E*. В НА вируса гриппа А(H5N1) замена *D94N* приводит к снижению связывания с α -2,6-СК и увеличению сродства к α -2,3-СК, а также усиливает НА-опосредованное слияние с мембраной клеток млекопитающих [33].

Мутация *E224A* в рецептор-связывающем сайте А(H1N1)pdm09 увеличивает сродство к α -2,3-СК (рецепторам «птичьего» типа), локализованным в лёгких человека [34].

Мутация *D222N* в рецептор-связывающем сайте также усиливает связь с α -2,3-СК. С мутациями *D222N* и *D222G* связывают тяжёлое течение гриппа, включая пневмонию и острый респираторный дистресс-синдром [35]. В результате молекулярно-генетического анализа вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, циркулировавших в России с 2009 по 2014 г., показано, что АК-замена *D* на *G* или *N* в положении 222 статистически значимо чаще выявлялась в лёгких умерших пациентов, нежели в респираторных мазках выздоровевших ($p < 0,0001$ и $p = 0,007$) [36]. В 2019–2020 гг. мутация *D222N* была обнаружена у 1 (2%) вируса из бронхоальвеолярного лаважа пациента с внебольничной пневмонией тяжёлой степени. В 2022–2023 гг. мутация *D222N* имела у вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, обнаруженных в образцах аутопсийного материала 12 пациентов (22% от количества вирусов из аутопсийного материала; 3% от общего количества).

Распределение вирусов А(H3N2) по генетическим группам соответствовало данным НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева: в 2019–2020 гг. циркулировали в соотношении 2 : 1 вирусы генетической подгруппы 3С.2а1b + Т131К (референс-штамм А/Южная Австралия/34/2019) и 3С.2а1b + Т135К-В (референс-штамм А/Гонконг/2675/2019)⁹; в 2021–2022 гг. превалировала генетическая группа 3С.2а1b.2а.2¹⁰, а в 2022–2023 гг. — под-

группа 3С.2а1b.2а.2 (референс-вирус Bangladesh/4005/2020¹¹).

В сезоне 2020–2021 гг. в НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева вирусы гриппа А(H3N2) не были выделены¹², при этом исследованные нами вирусы относились к группе 3С.2а1b.2а.2, что соответствовало данным ECDC: в популяции вирусов гриппа А(H3N2) циркулировали вирусы группы 3С.2а1b, большинство из которых относились к Камбоджа- (3С.2а1b.2а.1) и Бангладеш-подобным (3С.2а1b.2а.2) вирусам¹³.

С 1968 по 2003 г. антигенный дрейф вируса гриппа А(H3N2) был вызван в основном одиночными мутациями в 7 АК-позициях в НА (145 — в сайте А, 155, 156, 158, 159, 189, 193 — в сайте В) рядом с рецептор-связывающим сайтом [37].

В НА вируса гриппа А(H3N2) замена *A131D* (в наших образцах — *T131K*) увеличивает заряд молекулы НА и приводит к снижению нейтрализации моноклональным антителом [38]. Показано, что мутации *S193R* и *S193K* (в наших образцах — *S193F*) влияют на предпочтительное связывание вируса с α -2,6- и α -2,3-СК соответственно [39].

В НА вируса гриппа свиней А(H3N2) замена *S138A* (аналогична обнаруженной в исследованных нами образцах) приводит к снижению репликации вирусов в эпителиальных клетках респираторного тракта свиней, в которых экспрессируются рецепторы α -2,6- и α -2,3-СК [40].

В НА вируса гриппа А(H3N2) замена *K156Q* (в наших образцах — *H156S*) приводит к снижению действия нейтрализующих антител. Это обусловлено тем, что остаток этой АК формирует глобулярную головку НА, где образует новый эпитоп, приймающий к рецептор-связывающему домену [30].

Полученные нами данные распределения вирусов гриппа В по генетическим группам также соответствовали данным НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева: в 2019–2020 гг. абсолютное большинство секвенированных вирусов гриппа типа В относилось к кладу V1A (del162–164) Викторианской линии (референс-вирус В/Вашингтон/02/2019)¹⁴;

2022 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2022&week=24

¹¹ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2023 года. URL: https://influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2023&week=39

¹² НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2021 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2021&week=39

¹³ ECDC. Influenza virus characterisation, Summary Europe, July 2021. Stockholm; 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/influenza-virus-characterisation-summary-europe-july-2021>

¹⁴ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю

⁹ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 39-ю неделю 2020 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2020&week=39

¹⁰ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 24-ю неделю

в сезоне 2021–2022 г. выявлены вирусы гриппа типа В/Виктория генетической подгруппы V1A.3a.2¹⁵, в сезоне 2022–2023 гг. вирусы гриппа типа В были отнесены к генетической подгруппе V1A.3a.2 и подобны референс-вирусу В/Austria/1359417/2021.

У 40 вирусов выявлена мутация *D197E* в рецептор-связывающем сайте НА. Значимость АК-замен в этом положении НА была экспериментально доказана группой исследователей путём пассирования штамма В/Brisbane/60/2008 в линии эпителиальных клеток лёгких человека Calu-3: после 10 последовательных пассажей в НА появилась мутация *D197T* и было показано, что штаммы с этой заменой обладали значительно более низкой аффинностью к α -2,3-СК («птичьего» типа). Это можно объяснить тем, что α 2,3-связанный гликан образует 2 водородные связи с аминокислотой в положении 197, и любая замена в этом положении может повлиять на связывание НА с рецепторами [41].

Заключение

В статье представлены результаты генетического мониторинга вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В, обнаруженных в 50 регионах России с 2019 по 2023 г. Полученные результаты отражают общие закономерности и позволяют судить об этиологической структуре гриппа, интенсивности эпидемического процесса и генетическом разнообразии циркулировавших в России вирусов.

В системе Роспотребнадзора мониторинг за вирусами гриппа проводится ежегодно, даже в сезоне 2020–2021 гг. на фоне пандемии COVID-19 скрининг больных на грипп методом ПЦР с гибридо-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, типирование и секвенирование обнаруженных вирусов гриппа продолжались в прежнем объёме. Именно поэтому можно констатировать, что в России на фоне пандемии COVID-19 в сезоне 2020–2021 гг. вирусы гриппа практически исчезли из циркуляции и появились снова в сезоне 2021–2022 года.

Выполненный анализ продемонстрировал явления непрерывной эволюции с появлением в каждом сезоне генетических вариантов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В, которые имели изменения в гене *НА* по сравнению с вакцинным штаммом. Мутации, приводящие к АК-заменам, были зафиксированы в антигенных сайтах, в области связывания с рецепторами, некоторые из них приводили к образованию новых потенциальных сайтов гликозилирования или к их потере.

При сравнении вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших в 2022–2023 гг. в России, с вакцинным штаммом 2019–2020 гг. А/Brisbane/02/2018 степень различий нуклеотидных последовательностей гена *НА* составила 2,7–3,1%, а с первым вакцинным штаммом вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 А/California/07/2009 — 5,0–5,3%.

Степень различий нуклеотидных последовательностей гена *НА* вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в 2022–2023 гг. в России, с вакцинным штаммом 2019–2020 гг. А/Kansas/14/2017 составила 5,3–6,0%.

Степень различий нуклеотидных последовательностей гена *НА* вирусов гриппа В/Виктория, циркулировавших в 2022–2023 гг. в России, с вакцинным штаммом 2019–2020 гг. В/Colorado/06/2017 составила 2,2–2,8%. Вирусы гриппа В/Ямагата за время исследования не были идентифицированы.

Наибольшая вариабельность НА наблюдалась у вирусов А(Н3N2), что вызвало необходимость замены вакцинного штамма 3 раза за 4 сезона.

Следует особо отметить, что все вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 сезона 2022–2023 гг. имели не встречавшуюся ранее мутацию *E224A* в НА, которая увеличивает сродство к α -2,3-СК, локализованным в лёгких человека, что может способствовать развитию осложнений. Мутация *D222N*, которая ассоциирована с более тяжёлым заболеванием, была обнаружена в НА 2% и 3% вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2019–2020 и 2022–2023 гг. соответственно.

В основном все вирусы гриппа были чувствительны к осельтамивиру и занамивиру, только у 2,3% вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2022–2023 гг. выявлена мутация устойчивости *H275Y* в НА. Во всех исследованных вирусах гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) обнаружена мутация устойчивости к адмантанам *S31N* в М2.

Полученные нами результаты могут помочь понять направление эволюции вирусов гриппа. Непрерывное появление мутаций вирусов гриппа представляет глобальную проблему для здравоохранения из-за того, что некоторые мутации обеспечивают селективное преимущество для репликации вирусов в верхних дыхательных путях и передачи от человека к человеку, а также снижают чувствительность к противирусным препаратам. Часть мутаций способствует более тяжёлому течению гриппа и развитию осложнений. Мутации в антигенных сайтах позволяют вирусам гриппа ускользать от анамнестических и поствакцинальных антител.

Следовательно, необходимо продолжать отслеживать вирусы гриппа с помощью молекулярно-генетического анализа, который позволяет проводить их глубокую дифференцировку и определять тренд эволюции вирусов гриппа: появление, распространение и исчезновение из циркуляции определённых генетических вариантов.

2020 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2020&week=39

¹⁵ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 24-ю неделю 2022 года. URL: https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/?year=2022&week=24

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Hause B.M., Collin E.A., Runxia L., et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio*. 2014;5(2):e00031–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00031-14>
2. Houser K., Subbarao K. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*. 2015;17(3):295–300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.012>
3. Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., et al. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000;288(5468):1051–3. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1051>
4. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014;1323(1):115–39. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12462>
5. Treanor J. Influenza vaccine — outmaneuvering antigenic shift and drift. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(3):218–20. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMp038238>
6. Saunders-Hastings P.R., Krewski D. Reviewing the history of pandemic influenza: understanding patterns of emergence and transmission. *Pathogens*. 2016;5(4):66. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens5040066>
7. Chang W.K. National influenza experience in Hong Kong, 1968. *Bull. World Health Organ.* 1969;41(3):349–51.
8. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., et al. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*. 1990;175(1):59–68. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90186-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90186-u)
9. Vijaykrishna D., Holmes E.C., Joseph U., et al. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *Elife*. 2015;4:e05055. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.05055>
10. Thyagarajan B., Bloom J.D. The inherent mutational tolerance and antigenic evolvability of influenza hemagglutinin. *Elife*. 2014;3:e03300. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.03300>
11. Wei C.J., Boyington J.C., Dai K., et al. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci. Transl. Med.* 2010;2(24):24ra21. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000799>
12. Job E.R., Deng Y.M., Barford K.K., et al. Addition of glycosylation to influenza A virus hemagglutinin modulates antibody-mediated recognition of H1N1 2009 pandemic viruses. *J. Immunol.* 2013;190(5):2169–77. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202433>
13. Sriwilajaroen N., Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2012;88(6):226–49. DOI: <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>
14. Glaser L., Stevens J., Zamarin D., et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J. Virol.* 2005;79(17):11533–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11533-11536.2005>
15. Virk R.K., Jayakumar J., Mendenhall I.H., et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020;117(1):619–28. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1916585116>
16. Cheng P.K., Leung T.W., Ho E.C., et al. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(6):966–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1506.081357>
17. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., et al. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*. 1991;182(2):475–85. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90588-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90588-3)
18. Соболев И.А., Курская О.Г., Шаршов К.А. и др. Изменчивость вируса гриппа типа А. Юг России: экология, развитие. 2016;11(1):170–7. Sobolev I.A., Kurskaya O.G., Sharshov K.A., et al. Variability of the influenza A virus. *South of Russia: ecology, development*. 2016;11(1):170–7. DOI: <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2016-1-170-177> EDN: <https://elibrary.ru/vsaur>
19. Ndifon W., Wingreen N.S., Levin S.A. Differential neutralization efficiency of hemagglutinin epitopes, antibody interference, and the design of influenza vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009;106(21):8701–6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903427106>
20. Wang Q., Cheng F., Lu M., et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J. Virol.* 2008;82(6):3011–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02477-07>
21. Wang Q., Tian X., Chen X., et al. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007;104(43):16874–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0708363104>
22. Еропкин М.Ю., Коновалова Н.И., Комиссаров А.Б. и др. Особенности эволюции вирусов гриппа, циркулировавших в России в течение 2-х сезонов, предшествовавших пандемии COVID-19, и в два пандемических сезона. В кн.: *Дни вирусологии 2022: Сборник тезисов III Международного форума, посвященного 55-летию со дня основания ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России*. СПб.;2022. Eropekin M.Yu., Konovalova N.I., Komissarov A.B., et al. Features of the evolution of influenza viruses that circulated in Russia during the 2 seasons preceding the COVID-19 pandemic and in two pandemic seasons. In: *Days of Virology 2022: Collection of abstracts of the III International Forum dedicated to the 55th anniversary of the founding of the Federal State Budgetary Institution "A.A. Smorodintsev Influenza Research Institute" of the Ministry of Health of Russia*. St. Petersburg;2022. EDN: <https://elibrary.ru/chdpfr>
23. Karpova L.S., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., et al. Comparison of the first three waves of the COVID-19 pandemic in Russia in 2020–21. *Epidemiol. Vaccine Prev.* 2022;21(2):4–16. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-2-4-16>
24. Zhu N., Zhang D., Wanget W., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(8):727–33. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
25. Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., et al. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J.* 2002;21(5):865–75. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.865>
26. Wang W., Lu B., Zhou H., et al. Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J. Virol.* 2010;84(13):6570–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00221-10>
27. Guarnaccia T., Carolan L.A., Maurer-Stroh S., et al. Antigenic drift of the pandemic 2009 A(H1N1) influenza virus in a ferret model. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003354. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003354>
28. Liang Y. Pathogenicity and virulence of influenza. *Virulence*. 2023;14(1):2223057. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2223057>
29. Yoshida R., Igarashi M., Ozaki H., et al. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2009;5(3):e1000350. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000350>
30. Imai M., Watanabe T., Hatta M., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*. 2012;486(7403):420–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10831>
31. Zhao X.N., Zhang H.J., Li D., et al. Whole-genome sequencing reveals origin and evolution of influenza A(H1N1)pdm09

- viruses in Lincang, China, from 2014 to 2018. *PLoS One*. 2020;15(6):e0234869.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234869>
32. Yasugi M., Nakamura S., Daidoji T., et al. Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS One*. 2012;7(2):e30946.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030946>
33. Su Y., Yang H.Y., Zhang B.J., et al. Analysis of a point mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells. *Arch. Virol.* 2008;153(12):2253–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0255-y>
34. Lakdawala S.S., Jayaraman A., Halpin R.A., et al. The soft palate is an important site of adaptation for transmissible influenza viruses. *Nature*. 2015;526(7571):122–5.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15379>
35. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., et al. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro Surveill.* 2010;15(9):19498.
DOI: <https://doi.org/10.2807/ese.15.09.19498-en>
36. Yatsyshina S., Renteeva A., Deviatkin A., et al. Molecular genetic analysis of the Influenza A(H1N1)pdm09 virus from lethal and recovered cases in Russia from 2009 to 2014: Deletions in the nucleoprotein. *Infect. Genet. Evol.* 2015;34:160–72.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.019>
37. Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M., et al. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science*. 2013;342(6161):976–9.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1244730>
38. Nakajima S., Nakajima K., Nobusawa E., et al. Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus hemagglutinin: mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. *Microbiol. Immunol.* 2007;51(12):1179–87.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb04013.x>
39. Medeiros R., Naffakh N., Manuguerra J.C., et al. Binding of the hemagglutinin from human or equine influenza H3 viruses to the receptor is altered by substitutions at residue 193. *Arch. Virol.* 2004;149(8):1663–71.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0287-2>
40. Busch M.G., Bateman A.C., Landolt G.A., et al. Identification of amino acids in the HA of H3 influenza viruses that determine infectivity levels in primary swine respiratory epithelial cells. *Virus Res.* 2008;133(2):269–79.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.01.014>
41. Ilyushina N.A., Lee N., Lugovtsev V.Y., et al. Adaptation of influenza B virus by serial passage in human airway epithelial cells. *Virology*. 2020;549:68–76.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.004>

Информация об авторах

Яцышина Светлана Борисовна — к. б. н., зав. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, svetlana.yatsyshina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Артамонова Анна Александровна — лаборант-исследователь лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0004-6845-9982>

Елькина Мария Александровна — н. с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4769-6781>

Валдохина Анна Владимировна — н. с. научной группы генной инженерии и биотехнологии, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Буланенко Виктория Петровна — н. с. научной группы генной инженерии и биотехнологии, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Берсенева Александра Андреевна — лаборант-исследователь лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии инфекций дыхательных путей, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1503-7629>

Акимкин Василий Геннадьевич — д. м. н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов: Яцышина С.Б. — концепция и дизайн исследования, руководство, редактирование; Артамонова А.А. — ПЦР, сборка последовательностей, анализ данных, написание текста; Елькина М.А. — ПЦР, сборка последовательностей, анализ данных; Валдохина А.В., Буланенко В.П. — секвенирование; Берсенева А.А. — ПЦР, сборка последовательностей; Акимкин В.Г. — руководство. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.03.2024;
принята к публикации 03.05.2024;
опубликована онлайн 23.09.2024

Information about the authors

Svetlana B. Yatsyshina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of respiratory tract infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, svetlana.yatsyshina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Anna A. Artamonova — laboratory researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of respiratory tract infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0004-6845-9982>

Maria A. Elkina — researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of respiratory tract infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4769-6781>

Anna V. Valdokhina — researcher, Scientific group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Victoria P. Bulanenko — researcher, Scientific group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Aleksandra A. Berseneva — laboratory researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of respiratory tract infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1503-7629>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution: Yatsyshina S.B. — research concept and design, supervision, editing; Artamonova A.A. — PCR, sequence assembly, data analysis; Elkina M.A. — PCR, sequence assembly, data analysis; Valdokhina A.V., Bulanenko V.P. — sequencing; Berseneva A.A. — PCR, sequence assembly; Akimkin V.G. — supervision. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.03.2024;
accepted for publication 03.05.2024;
published online 23.09.2024



Разработка и исследование вируснейтрализующей активности рекомбинантного человеческого антитела к F-гликопротеину респираторно-синцитиального вируса

Клотченко С.А.¹, Романовская-Романько Е.А.¹, Плотникова М.А.¹, Пулькина А.А.¹, Шалджян А.А.¹, Балабашин Д.С.², Топорова В.А.^{1,2}, Алиев Т.К.^{2,3}, Гюлиханданова Н.Е.¹, Лиознов Д.А.^{1,4}

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является ведущим в структуре возбудителей инфекций нижних дыхательных путей у детей, а также представляет серьезную угрозу для пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. Разработка терапевтического препарата на основе рекомбинантных человеческих антител, направленных на блокирование F-гликопротеина РСВ, является актуальной задачей, поскольку позволит снизить заболеваемость РСВ-инфекцией и предотвратит развитие осложнений данной инфекции.

Цель исследования — конструирование плазмидных векторов для накопления высокоактивного рекомбинантного моноклонального антитела FM1 в эукариотической системе экспрессии, направленного против F-гликопротеина РСВ, и оценка специфической активности полученного антитела в отношении различных штаммов РСВ подтипов А и В *in vitro*.

Материалы и методы. Получение экспрессионных конструкций, кодирующих рекомбинантное антитело FM1, выполняли методами геной инженерии. Накопление антитела проводили в клеточной линии СНО-K1 путём транзientной экспрессии. Препарат антитела очищали из культуральной жидкости методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда модифицированного белка А. Оценку вируснейтрализующей активности антитела оценивали в реакции микронейтрализации с несколькими штаммами РСВ на монослойной культуре клеток Vero.

Результаты. Создана двухплазмидная векторная система для экспрессии рекомбинантного антитела FM1 к F-гликопротеину РСВ, получен временный СНО-продуцент этого антитела. Антитело накоплено, очищено и охарактеризовано; доказана его биологическая активность. Продемонстрировано, что антитело обладает повышенной вируснейтрализующей активностью в отношении эталонных и сезонных штаммов РСВ подтипов А и В по сравнению с контрольным препаратом паливизумабом.

Заключение. Препарат на основе полученного рекомбинантного антитела FM1 позволит решить проблему импортозамещения средств защиты против РСВ-инфекции. В настоящее время коллектив авторов ведёт работу над получением стабильного клона-продуцента FM1 с высокой продуктивностью и жизнеспособностью, а также исследует терапевтическую эффективность этого антитела на модели сублетальной РСВ-инфекции у мышей.

Ключевые слова: *терапевтические моноклональные антитела, респираторно-синцитиальный вирус, F-гликопротеин, реакция нейтрализации, СНО-продуцент рекомбинантных антител, культура клеток Vero*

Благодарность. Авторы статьи выражают благодарность д. б. н. Вере Зорьевне Кривичкой за предоставленные для экспериментов штаммы респираторно-синцитиального вируса.

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России при софинансировании ООО «ОМК».

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

Для цитирования: Клотченко С.А., Романовская-Романько Е.А., Плотникова М.А., Пулькина А.А., Шалджян А.А., Балабашин Д.С., Топорова В.А., Алиев Т.К., Гюлиханданова Н.Е., Лиознов Д.А. Разработка и исследование вируснейтрализующей активности рекомбинантного человеческого антитела к F-гликопротеину респираторно-синцитиального вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):735–747.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-611>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-611>

Development and evaluation of a recombinant monoclonal human antibody with virus-neutralizing activity against the F glycoprotein of respiratory syncytial virus

Sergey A. Klotchenko¹, Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko¹, Marina A. Plotnikova¹, Anastasia A. Pulkina¹, Aram A. Shaldzhyan¹, Dmitry S. Balabashin², Victoria A. Toporova^{1,2}, Teimur K. Aliev^{2,3}, Natalia E. Gyulikhandanova¹, Dmitry A. Lioznov^{1,4}

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia;

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

⁴First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common pathogen causing lower respiratory tract infections in children. RSV also poses a serious threat to the elderly and immunocompromised patients. Developing a therapy based on recombinant human antibodies to block the RSV fusion (F) glycoprotein is urgent to reduce the incidence of RSV infections and prevent associated complications.

Aim. To design plasmid vectors for efficient production of the recombinant monoclonal antibody FM1 in a eukaryotic expression system targeting the RSV fusion (F) glycoprotein and to evaluate its activity against RSV subtypes A and B in vitro.

Materials and methods. Constructs encoding the recombinant antibody FM1 were designed using genetic engineering. Recombinant antibodies were produced in the CHO-K1 cell line through transient expression. Antibody specimens were purified from the culture supernatant using affinity chromatography, with a modified protein A as the ligand. The virus-neutralizing activity of the antibody was evaluated in a microneutralization assay using several RSV strains on a Vero cell monolayer culture.

Results. We developed a two-plasmid vector system to produce the recombinant FM1 antibody targeting the RSV F glycoprotein, using CHO cells as transient producers. The antibody was successfully produced, purified, and characterized, with its biological activity confirmed. The FM1 antibody demonstrated enhanced virus-neutralizing activity against reference and seasonal RSV strains of subtypes A and B compared to the control drug palivizumab.

Conclusion. A recombinant FM1 antibody-based drug could address the import substitution challenge for protective measures against RSV infection. The authors are currently developing a stable FM1 producer clone with high productivity and viability and investigating the therapeutic efficacy of this antibody in a sublethal RSV infection mouse model.

Keywords: *therapeutic monoclonal antibodies, respiratory syncytial virus, fusion (F) glycoprotein, neutralization assay, CHO cell line for recombinant antibodies production, Vero cells*

Funding source. The viral neutralizing activity assessment was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation, the work "Obtaining a candidate drug against respiratory syncytial infection based on recombinant monoclonal antibodies to F-protein" was carried out with the financial support of OMK LLC (agreement w/n on scientific and technical cooperation dated 07.07.2023, scientific research report from 17.10.2023).

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

For citation: Klotchenko S.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Plotnikova M.A., Pulkina A.A., Shaldzhyan A.A., Balabashin D.S., Toporova V.A., Aliev T.K., Gyulikhandanova N.E., Lioznov D.A. Development and evaluation of a recombinant monoclonal human antibody with virus-neutralizing activity against the F glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):735–747.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-611>

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

Введение

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является ведущим в структуре возбудителей инфекций нижних дыхательных путей у детей, а также представляет серьёзную угрозу для пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом [1, 2].

До 70% детей впервые переносят РСВ-инфекцию (РСВИ) в возрасте до 1 года, и практически каждый ребёнок инфицируется в течение первых 3 лет жизни. Частота верификации РСВИ у детей в возрасте до 3 лет, госпитализированных в связи с инфекцией нижних дыхательных путей, достигает 42–63% в развитых странах [3, 4]. Наиболее часто регистрируют бронхолит (50–90%), несколько реже — пневмонию (5–40%) и трахеобронхит (10–30%), летальность составляет в среднем 1% [5–7]. Согласно результатам метаанализа заболеваемости, в 132 развитых странах на РСВИ приходится более 3 млн случаев госпитализации в год и около 60 тыс. летальных исходов среди детей в возрасте до 5 лет [8, 9].

По данным диагностики методом полимеразной цепной реакции, проведённой в НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, в сезон 2023–2024 гг. в пиковый период подъёма заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями доля РСВ среди возбудителей респираторных заболеваний составила 26% без учёта SARS-CoV-2 и вирусов гриппа и 16% с учётом вирусов гриппа, что однозначно указывает на значительную роль РСВИ в структуре респираторных инфекций, прежде всего у детей в возрасте до 2 лет. Согласно данным НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, доля РСВИ среди госпитализированных пациентов составляет 13–19% [10]. Учитывая, что ежегодно в России регистрируется около 30 млн заболевших респираторными инфекциями, на долю РСВИ из них приходится не менее 3,9 млн случаев.

По оценкам T. Shi и соавт., 45% случаев госпитализаций и внутрибольничных смертей детей младше 6 мес обусловлены острой дыхательной недостаточностью, развивающейся вследствие РСВИ [9]. Поскольку в этом возрасте вакцины имеют меньшую иммуногенность, то для формирования пассивного иммунитета у младенцев могут быть использованы иммунизация матерей или введение моноклональных антител (МКА) с целью обеспечения лучшей защиты ребёнка.

Считается, что антитела играют ключевую роль в ограничении острой инфекции нижних дыхательных путей при РСВИ. Недавние исследования подчёркивают, что для формирования полноценного иммунного ответа, защищающего от реинфекции, необходима индукция иммунитета слизистой оболочки [11]. До недавнего времени единственным средством предотвращения РСВИ было гуманизированное МКА паливизумаб [12], которое применялось только в группах риска и требовало

неоднократного инъекционного введения. В настоящее время разработан и одобрен в ЕС и США новый препарат — нирсевимаб, обладающий большей стабильностью, что обеспечивает возможность его однократного введения [13–15]. В России для клинического применения зарегистрирован лишь паливизумаб. Разработка препарата для профилактики и терапии РСВИ на основе рекомбинантных человеческих нейтрализующих антител, взаимодействующих с поверхностным F-гликопротеином РСВ, позволит существенно снизить заболеваемость РСВИ детей младшего возраста, снизить инвалидизацию и смертность, вызываемую этим патогеном, и предотвратит развитие осложнений данной инфекции. Также остро стоит потребность в средствах профилактики и терапии РСВИ у лиц старшего возраста и иммунокомпрометированных больных.

Целью настоящего исследования было конструирование плазмидных векторов для накопления высокоактивного рекомбинантного МКА (рМКА) FM1 в эукариотической системе экспрессии, направленного против F-гликопротеина РСВ, и оценка специфической активности полученного антитела в отношении различных штаммов РСВ подтипов А и В *in vitro*.

Материалы и методы

Конструирование плазмидных векторов

Нуклеотидные вставки, кодирующие тяжёлую и лёгкую цепи рМКА FM1 (включая константные участки), собирали на основе опубликованных последовательностей антитела MED18897 [16] и синтезировали в компании «Евроген». Клонирование осуществляли в вектор pVAX1 с использованием сайтов рестрикции для эндонуклеаз Nhe I и Xho I. Скрининг колоний проводили методом полимеразной цепной реакции, наличие целевых вставок подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру в компании «Евроген», после чего созданные плазмидные конструкции pVAX1-FM1-NC и pVAX1-FM1-LC накапливали, очищали с использованием набора «Plasmid Miniprep 2.0» («Евроген») и использовали для трансфекции эукариотических клеток.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Препараты плазмидной ДНК и ампликоны анализировали в 0,8% агарозном геле, приготовленном на 1× TAE-буфере с содержанием бромистого этидия до 0,5 мкг/мл, с использованием 6× буфера для нанесения ДНК. Результаты электрофоретического разделения визуализировали с использованием «Gel Doc EZ Imager» («Bio-Rad»).

Клетки и вирусы

В экспериментах использовали перевиваемые культуры клеток: СНО-K1 (клетки яичника китай-

ского хомячка, ATCC #CCL-61) и Vero (клетки почки зелёной африканской мартышки, ATCC #CCL-81), полученные из банка клеточных культур ATCC (Американская типовая коллекция клеточных культур). Клетки CHO-K1 культивировали на среде F12K («Gibco») с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, «Gibco»), клетки Vero — на среде α -MEM («Биолот») с добавлением 5% FBS («Gibco»). Все эксперименты (за исключением этапов селекции продуцентов CHO-K1) проводили без добавления антибиотиков. В работе использовали суточные культуры. Все клеточные культуры поддерживали при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, в атмосфере 5% CO_2 , в условиях повышенной влажности (80–100%).

В работе использовали РСВ двух эталонных штаммов: А2 (подтип А), инфекционный титр $7,7 \text{ IgTID}_{50}/\text{мл}$ и 9320 (подтип В), инфекционный титр $6,8 \text{ IgTID}_{50}/\text{мл}$; а также 2 сезонных изолята РСВ: hRSV/A/Russia/RII-26062v/2022 (подтип А), инфекционный титр $6,8 \text{ IgTID}_{50}/\text{мл}$ и hRSV/B/Russia/RII-4759/2022 (подтип В), инфекционный титр $6,3 \text{ IgTID}_{50}/\text{мл}$ (Коллекция НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева).

В качестве препарата сравнения использовали коммерческий препарат «Синагис» («AstraZeneca»); раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, серия 406039, произведён 08.2023, годен до 07.2026), который представляет собой гуманизированное МКА паливизумаб, направленное против F-гликопротеина РСВ [17].

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) в сэндвич-формате проводили с использованием 96-луночных планшетов «Microlon High Binding» («Greiner Bio-One»), термошейкера для планшетов «PST-60HL-4» («BioSan»), коммерческих МКА, контрольного препарата паливизумаба, а также рекомбинантных антител и очищенных вирусов, полученных в НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. Захватывающие антитела против Fc-фрагментов тяжёлых цепей иммуноглобулинов человека (#ab77118, «Abcam») сорбировали в концентрации 1 мкг/мл в объёме 100 мкл на лунку при 4°C в течение ночи. Блокировку проводили раствором 5% обезжиренного молока («Blotting-Grade Blocker», #1706404, «Bio-Rad») на фосфатно-солевом буфере с Твином-20 до 0,05% (PBST) при 37°C в течение 1 ч. Инкубацию с анализируемыми пробами проводили при 37°C в течение 2 ч, после чего вносили выявляющие антитела против лёгких каппа-цепей иммуноглобулинов человека (#4G7cc, «Hytest»), конъюгированные с пероксидазой хрена, в рекомендуемой производителем концентрации и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После стандартной детекции с использованием субстратной смеси тетраметилбензидина («Хема») и

однонормальной серной кислоты измеряли оптическую плотность (ОП) на длинах волн 450 нм (ОП₄₅₀) и 655 нм (ОП₆₅₅) на микропланшетном спектрофотометре «Multiskan SkyHigh» («Thermo Fisher Scientific»). В качестве порогового значения брали среднее значение показателей ОП₄₅₀₋₆₅₅ по всем отрицательным контролям плюс 3 стандартных отклонения.

Хроматографическая очистка рекомбинантных антител

Хроматографическую очистку рекомбинантных антител проводили методом аффинной хроматографии при помощи хроматографической системы «AKTA pure» на колонке «MabPurix P45» («Sepax») объёмом 5 мл. Колонку промывали 10 CV (column volume) стартового буфера (1× PBS) на скорости потока 5 мл/мин. Культуральную жидкость (50 мл), предварительно профильтрованную через шприцевой фильтр «Sartorius» (размер пор 0,45 мкм, материал мембраны полиэфирсульфон), вносили в хроматограф через насос для ввода образцов на скорости потока 2,5 мл/мин. Далее колонку промывали 10 CV стартового буфера на скорости потока 5 мл/мин. Антитела элюировали 100% элюирующим буфером (20 mM глицин, pH 3,0) в объёме 15 CV на скорости потока 5 мл/мин. Мониторинг осуществляли по ОП₂₈₀. На этапе элюции при помощи автоматического коллектора отбирали пик с ОП выше 0,05 AU. К собранному материалу добавляли 1 M раствор Трис-HCl pH 8,8 (20 мкл/мл) и 4 M раствор NaCl (40 мкл/мл). Для увеличения стерильности и предупреждения деградации и контаминации полученный препарат фильтровали при помощи шприцевого фильтра «Sartorius» (размер пор 0,45 мкм, материал мембраны полиэфирсульфон) и использовали для дальнейших исследований.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу Лэммли [18] в восстанавливающих (в присутствии β -меркаптоэтанола) и невосстанавливающих условиях. Использовали 15-луночный градиентный гель Any kD (#4568126, «Bio-Rad»). Перед нанесением образца в лунки ПААГ его смешивали с 4-кратным буфером Лэммли, после чего проводили денатурацию белка при 95°C в твёрдотельном термостате «Гном» («ДНК-Технология») в течение 10 мин (восстанавливающие условия). В каждую лунку вносили по 2,5 мкг образца белка. Концентрацию белков оценивали на спектрофотометре «NanoDrop ND-1000» («Thermo Fisher Scientific»), для антител использовали режим IgG, при котором значение $E 1\% = 13,70$. Электрофоретическое разделение белков проводили при постоянной силе тока (25 mA на гель) в течение 45 мин в вертикальной электрофоретической ячейке «Mini-PROTEAN Tetra» («Bio-Rad»). Гель окрашивали

коллоидным раствором Кумасси [19]. Изображение окрашенного геля получали на гель-документирующей станции «Gel Doc EZ Imager» («Bio-Rad»).

Реакция микронейтрализации и определение полумаксимальной ингибирующей дозы

Оценку вируснейтрализующей активности рекомбинантных антител выполняли на монослойной культуре клеток Vero с использованием метода, описанного ранее [20]. Серии трёхкратных разведений препаратов рекомбинантных антител (3 независимых повтора) смешивали с эквивалентным объёмом ростовой среды, содержащей 100 ТИД₅₀ РСВ, и после 1 ч инкубации при комнатной температуре полученные разведения переносили в планшеты с суточным монослоем клеток Vero. Планшеты инкубировали в течение 4 сут в CO₂-инкубаторе при 37,0 ± 0,5°C в условиях повышенной влажности (80–100%). Ингибирование репликации РСВ в присутствии различных концентраций рМКА определяли на 4-е сутки после заражения методом клеточного ИФА с использованием в качестве первичных антител мышинных МКА 4F2, специфичных к F-гликопротеину РСВ подтипа А и В (НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева), и вторичного конъюгата Goat Anti-Mouse IgG (H+L), меченного пероксидазой хрена («Bio-Rad»). После проявления конъюгата ОП измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра «Multiskan SkyHigh» («Thermo Fisher Scientific») и вычисляли как разницу ОП_{450–620}. Полученные значения ОП были трансформированы в процент ингибирования развития цитопатического действия вируса при определённой концентрации рекомбинантных антител. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали по результатам построения четырёхпараметрической кривой «доза–эффект» с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 9.5.1» на основании 3 независимых повторов.

Первичные данные и статистическая обработка

Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах «Microsoft Office Excel 2010» и «GraphPad Prism 9.5.1». Для представления данных использовали следующие статистические показатели: стандартное отклонение, среднее арифметическое, стандартную ошибку среднего. Для проверки гипотезы о нормальности полученного распределения значений использовали тест Шапиро–Уилка, для определения значимости различий между групповыми средними — t-критерий Стьюдента. Априорный уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p < \alpha$ [21].

Результаты

Дизайн и получение экспрессионных конструкций, кодирующих рекомбинантное антитело FM1

За основу для дизайна человеческого рМКА длительного действия FM1, предназначенного для профилактики заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных РСВИ, были выбраны последовательности антитела MEDI8897 [16].

Разрабатываемое антитело представляет собой рекомбинантный человеческий иммуноглобулин класса IgG1κ. MEDI8897 имеет следующие последовательности гипервариабельных участков: в лёгкой цепи — L1 QASQDIVNYLN, L2 VASNLET и L3 QQYDNLPLT; в тяжёлой цепи — H1 DYIIN, H2 GIIPVLGTVVHYGPKFQG и H3 VSETYLPHYFDN [16]. Константная область лёгкой цепи MEDI8897 относится к κ-изотипу человека (кодируется κ-локусом 2p11.2 на 2-й хромосоме) и полностью идентична канонической последовательности P01834, представленной в открытой базе данных последовательностей белков «UniProt» [22]. Константная последовательность тяжёлой цепи MEDI8897 относится к классу иммуноглобулинов G1 (sIgG1, секретируемая форма) и имеет несколько отличий от последовательности P01857, представленной в «UniProt». В частности, кроме намеренно введённых в MEDI8897 3 аминокислотных замен в CH2-домене константной области (M257Y/S259T/T261E, [YTE]), обеспечивающих пролонгированную циркуляцию антитела в крови [16], в константных областях MEDI8897 нами также были выявлены 2 замены: K97R (VAR_003886) и D239E (VAR_003887), являющиеся вариативными природными заменами в аллелях [22]. Таким образом, несмотря на наличие вариаций, для клонирования были выбраны аминокислотные последовательности антитела, полностью соответствующие последовательностям тяжёлой и лёгкой цепей у MEDI8897 [16].

Для продукции рМКА FM1 была выбрана 2-плазмидная система экспрессии, которая подразумевает наличие 2 векторных конструкций, одна из которых кодирует тяжёлую, а вторая — лёгкую полноразмерные цепи антитела, т.е. цепи в конструкциях содержат как вариабельные, так и константные области антитела, а также сигнальные пептиды.

Для клонирования был выбран вектор pVAX1, содержащий CMV-промотор, T7-промотор на 5'-конце вставки и сайт полиаденилирования (из бычьего гормона роста), селективными антибиотиками для вектора являлись: в бактериальной системе — ампициллин, в эукариотической — неомицин (канамицин).

Методами генетической инженерии на базе вектора pVAX1 были собраны конструкции pVAX1-FM1-НС (общей длиной 4349 п. н.) и

pVAX1-FM1-LC (3632 п. н.), способные к экспрессии и продукции рМКА FM1 в эукариотических клетках в формате полноразмерного гетеротетрамера IgG1к. Схематические изображения полученных конструкций представлены на **рис. 1**. Обе последовательно, тяжёлая цепь (общая длина 1428 п. н., размер варибельной части 378 п. н.) и лёгкая цепь (общая длина 711 п. н., размер варибельной части 321 п. н.), содержат последовательность Козак, N-концевые лидерные пептиды, обеспечивающие секрецию полноразмерного антитела, и фланкированы сайтами рестрикции *Nhe I* (на 5'-конце) и *Xho I* (на 3'-конце).

Разработанные плазмидные конструкции способны к конститутивной экспрессии в эукариотических клетках (за счёт наличия в них промотора CMV) зрелых полиаденилированных мРНК, кодирующих тяжёлую и лёгкую цепи рМКА FM1.

Получение стабильных эукариотических пулов-продуцентов рекомбинантного антитела FM1 путём временной трансфекции

Продукцию рМКА FM1 проводили путём временной трансфекции 2-плазмидной системой эукариотической клеточной линии CHO-K1, обеспечивающей правильную конформацию и корректное гликозилирование формируемого антитела. Для накопления рМКА FM1 был выбран вариант моноселекции, при котором трансфекцию клеток CHO-K1 осуществляли плазмидными конструкциями на базе одного вектора pVAX1. Для этого использовали полученные конструкции pVAX1-FM1-HC и pVAX1-FM1-LC и коммерческий реагент

Lipofectamine 3000 («Thermo Fisher Scientific»). В качестве селективного агента для клеток-продуцентов, полученных с использованием линии CHO-K1, использовали антибиотик генетицин (аналог неомицина) в диапазоне концентраций 100–400 мкг/мл (для селекции клонов, несущих ген устойчивости *NeoR/KanR*).

Для повышения вероятности получения большего количества продуцирующих антитела клонов перед каждым клонированием проводили адаптацию пула трансфицированных клеток к селективным условиям. Процесс адаптации заключался в пассировании клеток на селективной среде каждые 3–4 сут. В это время клетки, лишённые генетической конструкции, в том числе гена селективного маркера, погибали. Через несколько пассажей жизнеспособность клеток в пуле восстанавливалась за счёт увеличения скорости роста клеток, адаптированных к селективной среде.

Согласно результатам сэндвич-ИФА (с использованием нижних антител против Fc-фрагмента тяжёлых цепей и верхних антител против лёгких к-цепей иммуноглобулинов человека, позволяющих выявлять только полноразмерные гетеротетрамеры IgG1к), трансфицированные клетки CHO-K1 были способны к стабильной продукции антитела FM1. Оценку динамики накопления рМКА проводили в течение первых 6 сут, далее клетки формировали 100% монослой, продукция клетками целевого продукта достигала постоянного уровня и прямо коррелировала с количеством клеток. Концентрация рМКА FM1 в супернатантах, полученных от клеток CHO-K1 при транзиторной экспрессии, была изме-

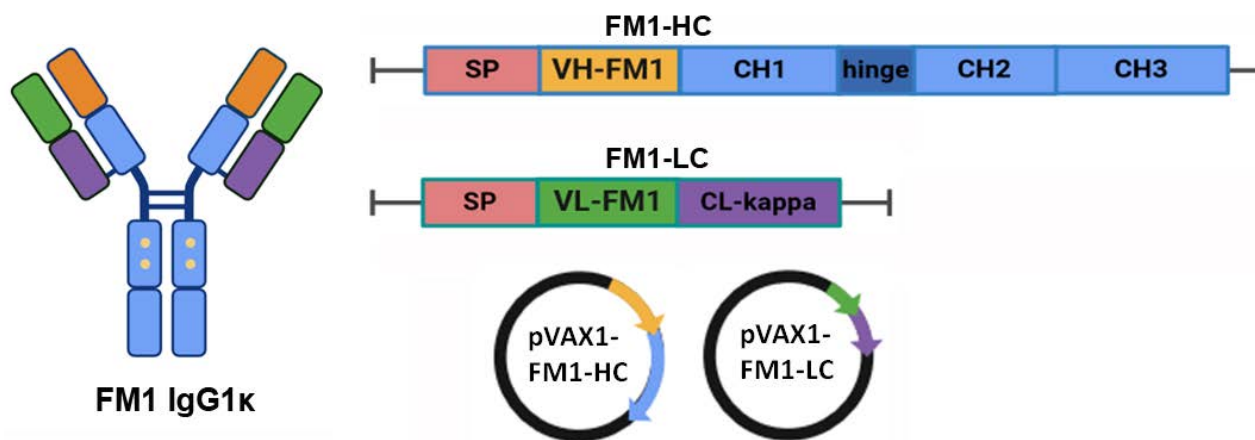


Рис. 1. Дизайн и получение экспрессионных конструкций, кодирующих рМКА FM1 в формате полноразмерного гетеротетрамера IgG1к.

FM1-HC — тяжёлая цепь; FM1-LC — лёгкая цепь; SP — сигнальные пептиды; VH-FM1 — варибельный домен тяжёлой цепи; CH1, CH2 и CH3 — константные домены тяжёлой цепи; hinge — шарнирный участок; VL-FM1 — варибельный домен лёгкой цепи; CL-kappa — константный домен лёгкой к-цепи.

Fig. 1. Design and production of expression constructs encoding the recombinant antibody FM1 in the format of a full-size IgG1k heterotetramer.

FM1-HC — heavy chain, FM1-LC — light chain, SP — signaling peptides, VH-FM1 — variable domain of heavy chain, CH1, CH2 and CH3 — constant domains of heavy chain, hinge — hinge section, VL-FM1 — variable domain of light chain, CL-kappa — constant domain of the light k-chain.

рена методом сэндвич-ИФА и составила 10 мкг/мл. Через 15 дней культивирования удалось получить популяции, способные к стабильному размножению в условиях селекции и производящие рМКА FM1. Далее полученные временные СНО-продукты были использованы для накопления препаративного количества рМКА FM1 и его последующей хроматографической очистки.

Накопление, очистка, анализ целостности и оценка специфической активности рекомбинантного антитела FM1

Очистку рМКА FM1 из культуральной жидкости проводили методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда модифицированного белка А (MabPurix P45, «Серах»). Супернатант от клеток СНО-К1 собирали в течение 1 мес через каждые 5 сут. Очистка была проведена примерно из 300 мл клеточного супернатанта, что позволило получить 2,8 мг препарата рМКА FM1 для исследования его специфической и вируснейтрализующей активности.

Хроматограмма очистки исходного препарата методом аффинной хроматографии представлена на **рис. 2, а**. Концентрация очищенного препарата FM1 составила около 0,7 мг/мл. Анализ целостности препарата был проведён методом электрофореза в ПААГ по методу Лэммли [18] (**рис. 2, б**).

рМКА состоит из 4 полипептидных цепей: 2 тяжёлых и 2 лёгких, соединённых в гетеротетрамер дисульфидными связями. На электрофореграмме в невосстанавливающих условиях антитело имеет молекулярный вес около 150 кДа, в восстанавливающих условиях на дорожках видны мажорные фрагменты молекулярной массой 50–60 и 25–30 кДа, которые соответствуют тяжёлой и лёгкой цепям рМКА. Показано, что очищенный препарат FM1 содержит главным образом рекомбинантные иммуноглобулины без видимых примесей.

Для оценки специфической активности препарата FM1, а именно способности связывать целевые антигены, был проведён ИФА в 2 вариантах: при сорбции инактивированного формалином очищенного РСВ на подложку, а также ИФА *in-cell* — при

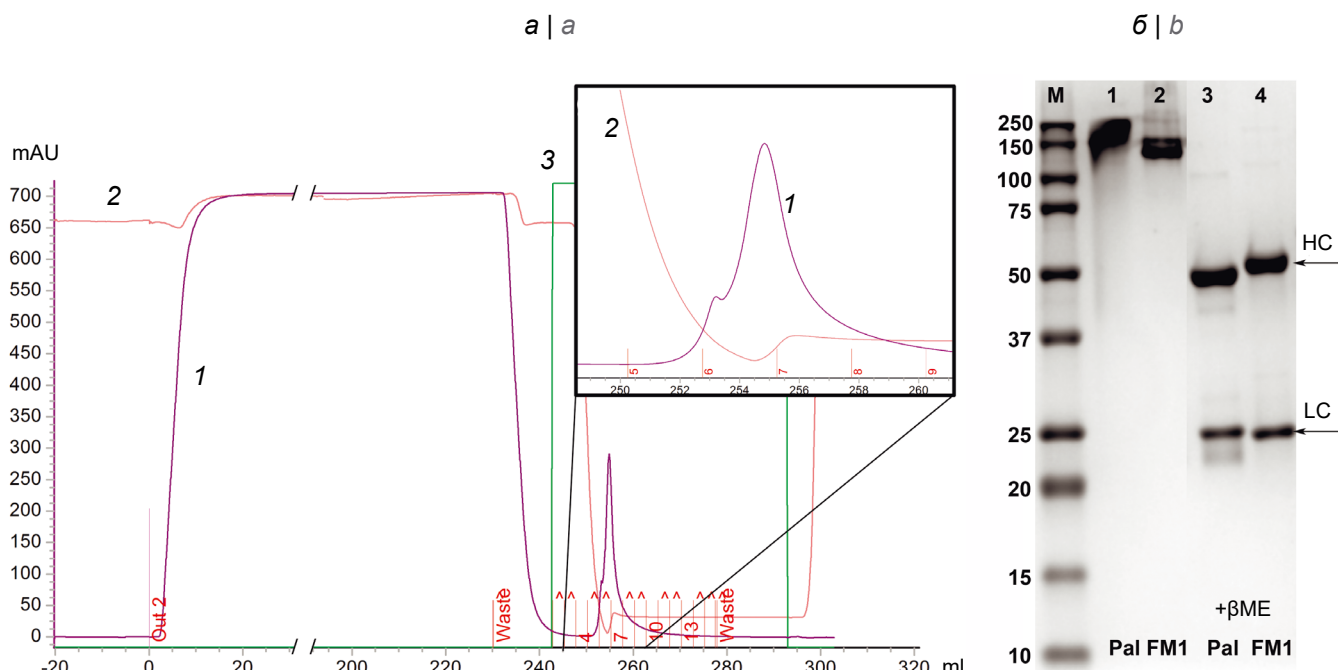


Рис. 2. Очистка и анализ препарата рМКА FM1.

а — хроматограмма очищенного препарата FM1 (в рамке — пик элюции, увеличенное изображение). 1 — поглощение на длине волны 280 нм; 2 — проводимость (мСм/см); 3 — элюция (% элюирующего буфера).
б — результаты электрофореза в ПААГ очищенного препарата FM1 в сравнении с контрольным препаратом паливизумабом (Pal). Препараты нанесены в невосстанавливающих (дорожки 1 и 2) и восстанавливающих условиях (дорожки 3 и 4; βME — β-меркаптоэтанол). М — маркер молекулярных масс «Precision Plus Protein Kaleidoscope» («Bio-Rad»). На дорожках 3 и 4 видны зоны, соответствующие электрофоретической подвижности тяжёлой (HC) и лёгкой (LC) цепей рМКА. Гель окрашен коллоидным раствором Кумасси и документирован при помощи системы «Gel Doc EZ Imager» («Bio-Rad»).

Fig. 2. Purification and analysis of the recombinant antibody FM1 specimen.

a — chromatogram of the purified FM1 preparation (the peak of elution is framed, enlarged image). 1 — absorption at a wavelength of 280 nm (MAU); 2 — conductivity (mSm/cm); 3 — elution (% of the elution buffer).
b — the results of the electrophoresis in PAAG of the purified FM1 drug compared with the control drug palivizumab (Pal). The preparations were applied in non-reduced (tracks 1 and 2) and reduced conditions (tracks 3 and 4; βME — β-mercaptoethanol). M — molecular weight marker (Bio-Rad). On tracks 3 and 4 there are visible zones corresponding to electrophoretic mobility of recombinant antibody heavy (HC) and light (LC) chains. The gel was colored by Coomassie colloidal solution and processing using the Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

заражении клеток Vero штаммами РСВ А2 и РСВ В 9320 в разных дозах. Результаты ИФА показали, что полученный препарат FM1 специфически связывает очищенный РСВ в концентрациях, сравнимых с контрольным препаратом паливизумабом (данные не представлены).

Оценка вируснейтрализующей активности рекомбинантного антитела FM1

Для исследования биологической активности полученного препарата FM1 была проведена оценка его способности нейтрализовать инфекционный РСВ различных подтипов *in vitro*. Реакция микронейтрализации была выполнена на культуре клеток Vero в отношении эталонных штаммов РСВ А2 и РСВ В 9320, а также сезонных штаммов РСВ, изолированных в Санкт-Петербурге: hRSV/A/

Russia/RII-26062v/2022 (РСВ А) и hRSV/B/Russia/RII-4759/2022 (РСВ В). Детекцию степени ингибирования цитопатического действия штаммов РСВ оценивали методом ИФА с последующей трансформацией значений ОП₄₅₀₋₆₅₅ в процент нейтрализации при определённой концентрации рекомбинантных антител. По результатам построения кривой «доза-эффект» на основании 3 независимых повторов была рассчитана 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) в отношении каждого протестированного штамма (рис. 3). В качестве препарата сравнения использовали паливизумаб.

Препарат FM1 проявлял нейтрализующую активность в отношении эталонных и сезонных штаммов как РСВ А, так и РСВ В. Показатели IC₅₀ для препарата FM1 были достоверно более низкими по сравнению с показателями IC₅₀ для контроль-

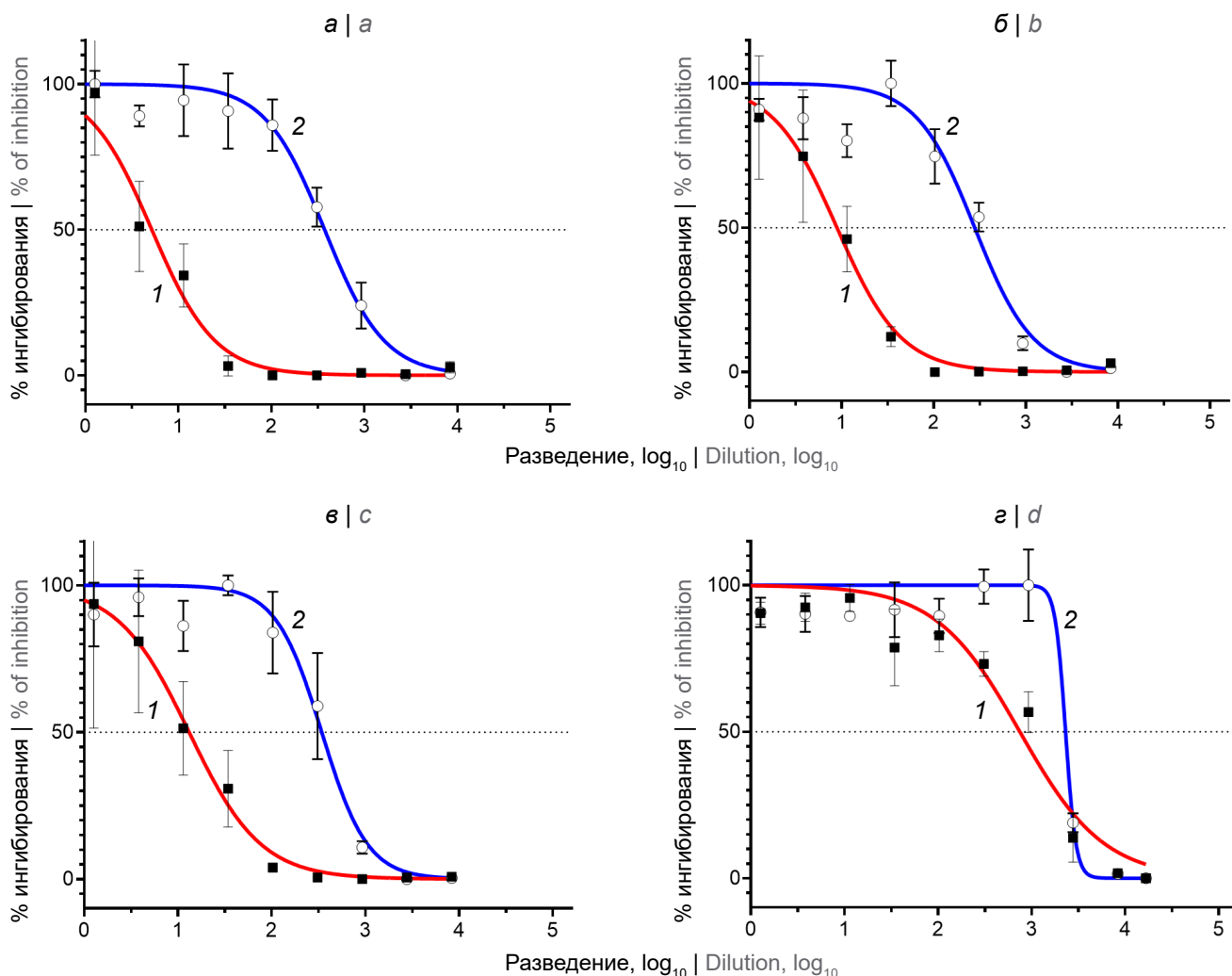


Рис. 3. Нейтрализующая активность препарата FM1 (1) и паливизумаба (2) в отношении штаммов РСВ А2 (а), сезонного РСВ А (б), РСВ В 9320 (в) и сезонного РСВ В (д).

Определение титра нейтрализующих антител было выполнено в 3 независимых повторах, для каждой точки на графике представлено среднее значение нормализованного процента ингибирования ± стандартное отклонение.

Fig. 3. Neutralizing activity of the FM1 drug (1) and the control drug palivizumab (2) against RSV strains A2 (a), seasonal RSV A (b), RSV B 9320 (c) and seasonal RSV B (d).

The titer of neutralizing antibodies was determined in 3 independent repeats, for each point the graph shows the mean value of the normalized percentage of inhibition ± standard deviation.

Сравнительный анализ нейтрализующей активности препарата FM1 и паливизумаба в отношении РСВ подтипов А и В
Comparative analysis of the neutralizing activity of the drug FM1 and the control drug palivizumab against A and B RSV subtypes

Штамм РСВ RSV strain	Среднее значение IC ₅₀ , нг/мл (95% доверительный интервал) Mean of IC ₅₀ , ng/mL (95% confidence interval)	
	FM1	паливизумаб palivizumab
РСВ А2 RSV A2	5,186* (3,858–6,986)	374,2 (256,1–538,5)
РСВ А сезонный RSV A seasonal	8,896* (6,196–12,55)	278,4 (190,7–395,9)
РСВ В 9320 RSV B 9320	13,18* (8,491–20,42)	342,7 (250,3–460,3)
РСВ В сезонный RSV B seasonal	748,2* (530,1–1030)	2306 (—)

Примечание. Нормальность распределения значений IC₅₀ была подтверждена с использованием теста Шапиро–Уилка ($p > 0,05$).

*Отмечена достоверность выявленных различий (с уровнем значимости $p < 0,01$) по сравнению с паливизумабом, рассчитанная с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Note. The distribution of the obtained IC₅₀ values did not differ significantly from normal (Shapiro–Wilk test, $p > 0.05$).

* $p < 0.01$ between group means compared with palivizumab, Student's *t*-test.

ного препарата (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$; **таблица**).

Обсуждение

РСВ является ведущим возбудителем тяжёлой пневмонии у детей, требующей госпитализации, а также представляет серьёзную угрозу для пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. В настоящее время не зарегистрированы противовирусные препараты для этиотропной терапии РСВИ. В России для профилактики РСВИ у детей одобрен препарат на основе МКА — паливизумаб, применение которого имеет ряд клинических и экономических ограничений.

В 2023 г. впервые за последние 20 лет в мире были одобрены сразу 3 иммунобиологических препарата для профилактики РСВИ: вакцина для людей старше 60 лет, вакцина для беременных и препарат на основе человеческого рМКА нирсевимаб. Нирсевимаб имеет расширенные показания к применению и рекомендуется всем новорождённым в первый сезон циркуляции РСВ и детям до 2 лет из групп высокого риска в течение 2-го сезона [23, 24].

Основной антигенной мишенью при разработке профилактических и терапевтических средств против РСВИ является поверхностный F-гликопротеин РСВ, стабилизированный в конформации «до слияния» (префузионной конформации), поскольку антитела к такому антигену обладают высокой вируснейтрализующей активностью [25]. Последовательность данного гликопротеина высококонсервативна среди различных подтипов и генотипов РСВ. При этом снижение активности белка F РСВ препятствует слиянию вируса с клеткой, нарушает механизм его проникновения и защищает хозяина от инфекции [26, 27]. Таким образом, получение препаратов на основе антител, направленных на блокирование F-гликопротеина РСВ в префузионной конформации, является актуальной задачей.

Антитело MEDI8897 (нирсевимаб) [28, 29] представляет собой человеческое рМКА класса IgG1κ, способное к высокоаффинному связыванию консервативного пространственного эпитопа, который образуют субъединицы F1 и F2 F-гликопротеина РСВ в префузионной конформации (сайт Ø, а. о. 62–69 для F2 и 196–212 для F1) [30]. Данное связывание препятствует конформационной подвижности F-гликопротеина, необходимой для слияния мембран вирусной частицы и клетки, которое опосредовано этим белком, таким образом, антитело MEDI8897 блокирует процесс слияния и предотвращает проникновение вируса в клетку хозяина. Fc-фрагмент антитела MEDI8897 имеет 3 аминокислотных замены, наличие которых существенным образом увеличивает время циркуляции антитела в кровотоке. Таким образом, однократная внутримышечная инъекция MEDI8897 позволяет обеспечить защиту организма в течение одного эпидемического сезона РСВИ (т. е. около 150 дней после введения) [13, 14]. Данное антитело обладает нейтрализующим эффектом в отношении штаммов РСВ человека антигенных подтипов А и В, циркулирующих одновременно в рамках локальных эпидемий, и предназначено для профилактики заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных РСВИ [30].

В нашей работе было получено и охарактеризовано человеческое рМКА FM1, дизайн которого проведён на основе последовательностей тяжёлой и лёгкой цепей антитела MEDI8897 [16]. Дополнительно были выбраны последовательности сигнальных пептидов, обеспечивающих секрецию полноразмерного антитела для его эффективного накопления во внеклеточном пространстве.

рМКА, как и многие другие белки, секретруются клетками по пути котрансляционной транслокации. У эукариот сигнальный пептид, содержащий 5–30 аминокислотных остатков, которые присутствуют на N-конце экспрессирующихся белков, узнаётся частицей распознавания сигнала

в цитозоле ещё в процессе синтеза на рибосомах, а после прохождения эндоплазматического ретикула сигнала пептид отщепляется сигнальной пептидазой. Эффективная экспрессия тяжёлой и лёгкой цепей требует соответствующих сигнальных пептидов для транспортировки полипептидных цепей антитела в эндоплазматический ретикулум для надлежащего сворачивания, сборки, а затем посттрансляционной модификации в аппарате Гольджи.

Поскольку информация о последовательностях, кодирующих сигнальные пептиды в конструкциях тяжёлой и лёгкой цепей у MEDI8897, в литературе отсутствовала, нами была выбрана комбинация сигнальных пептидов H7/L1 по работе R. Naryadi и соавт. [31], в которой были проанализированы 8 сигнальных пептидов тяжёлой цепи и 2 сигнальных пептида лёгкой цепи на предмет их влияния на уровень продукции в клетках CHO 5 наиболее коммерчески успешных терапевтических рМКА. В работе показано, что наилучшим сигнальным пептидом для тяжёлой цепи большинства протестированных антител (адалиумаба, бевациумаба, инфликсимаба) являлась последовательность H7. При выборе между последовательностями L1 и L2 мы руководствовались тем, что в случае L1 во вставке сохранялась консенсусная последовательность Козак, играющая важную роль в усилении трансляции у эукариот [32].

Для высокопроизводительной экспрессии и продукции рМКА FM1 в эукариотических клеточных линиях была выбрана 2-плазмидная система экспрессии на базе вектора pVAX1. Были получены генно-инженерные конструкции для тяжёлой и лёгкой цепей рМКА FM1, содержащие переменные и константные области антитела, а также сигнальные пептиды, при котрансляции которых формируется полноразмерное рМКА FM1.

Накопление и получение рМКА FM1 было проведено путём транзиторной экспрессии. В качестве продуцента антитела FM1 была выбрана эукариотическая клеточная линия CHO-K1. Путём трансфекции этих клеток 2-плазмидной векторной системой был получен временный CHO-продуцент рМКА FM1. Трансфицированные клетки адаптировали к селективным условиям для получения большего числа клонов, продуцирующих антитела. Проведено длительное культивирование временно продуцента для накопления рМКА FM1, которые затем были очищены из культуральной жидкости методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда модифицированного белка А. Отсутствие видимых примесей было подтверждено методом белкового электрофореза в ПААГ.

Основным методом для характеристики специфической активности МКА является оценка их нейтрализующей активности в отношении инфекционного вируса методом биологической нейтра-

лизации. Реакции микронейтрализации представляют собой группу методик, которые основаны на подсчёте регистрируемых показателей: ингибирование развития цитопатического действия вируса с учётом методом ИФА [33], подавление образования бляшек [34, 35], спектрофотометрическое определение жизнеспособности клеток [36] или снижение сигнала при использовании в качестве антигена люминесцентного/флуоресцентного репортерного вируса [37].

Поскольку на результат, полученный методом биологической нейтрализации, влияет множество переменных, таких как тип использованных клеточных линий, способ детекции, длительность инкубации и др., для изучения специфической активности препарата МКА необходимо использование препарата сравнения с известными характеристиками, что позволяет определить относительную активность исследуемого препарата. В нашей работе была доказана биологическая активность препарата рМКА FM1 в сравнении с зарегистрированным препаратом-аналогом. В качестве внешнего положительного контроля был использован коммерческий препарат на основе гуманизированных МКА «Синагис» (паливизумаб). Специфическая активность рМКА FM1 в отношении очищенного вируса была подтверждена методом ИФА при сорбции инактивированного формалином препарата РСВ на подложку, а также методом ИФА *in-cell* при заражении клеток Vero штаммами РСВ A2 и РСВ B 9320 в разных дозах.

Специфическая активность антитела FM1 в отношении инфекционного вируса была продемонстрирована в реакции микронейтрализации с РСВ различных подтипов. Были построены кривые дозозависимости и определена 50% ингибирующая концентрация. Показано, что препарат рМКА FM1 обладает повышенной вируснейтрализующей активностью по сравнению с контрольным препаратом паливизумабом в отношении РСВ подтипов А и В — как эталонных, так и сезонных штаммов. Так, показатели IC_{50} у исследованного образца антитела FM1 оказались достоверно более низкими по сравнению с внешним положительным контролем в отношении всех проверенных штаммов: для РСВ A2 — примерно в 72 раза, сезонного РСВ А — в 31 раз, РСВ B 9320 — в 26 раз, сезонного РСВ В — в 3 раза.

Среднеингибирующая концентрация препарата сравнения паливизумаба в представленном исследовании в отношении эталонного штамма РСВ A2 составила 0,374 мкг/мл, что согласуется с опубликованными ранее значениями и является дополнительным фактором валидности полученных результатов. Так, значение IC_{50} в отношении эталонного штамма РСВ A Long в различных исследованиях составляло от 0,353 [38] до 0,453 мкг/мл [39], а специфическая активность (концентрация,

необходимая для уменьшения размера бляшек на 60%) паливизумаба в отношении РСВ А2 — 0,57 мкг/мл [40].

Таким образом, нами получен кандидатный препарат против РСВ на основе человеческих рМКА, который способен к специфичному связыванию очищенного РСВ обоих серотипов, циркулирующих в человеческой популяции, а также обладает повышенной вируснейтрализующей активностью в отношении как эталонных, так и сезонных штаммов РСВ подтипов А и В, по сравнению с контрольным препаратом паливизумабом.

Заключение

Разработано и получено рМКА FM1 к F-гликопротеину РСВ, обладающее повышенной вируснейтрализующей активностью в отношении эталонных и сезонных штаммов РСВ подтипов А и В по сравнению с паливизумабом. В настоящее время коллектив авторов ведёт работу над получением стабильного клона-продуцента рМКА FM1 с высокой продуктивностью и жизнеспособностью, а также проводит исследование терапевтической эффективности препарата рМКА FM1 на модели сублетальной РСВИ у мышей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Openshaw P.J.M., Chiu C., Culley F.J., et al. Protective and harmful immunity to RSV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 2017;35(1):501–32. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052206>
2. Tin Tin Htar M., Yerramalla M.S., Moïsi J.C., Swerdlow D.L. The burden of respiratory syncytial virus in adults: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol. Infect.* 2020;148:e48. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268820000400>
3. Staadegaard L., Caini S., Wangchuk S., et al. The global epidemiology of RSV in community and hospitalized care: findings from 15 countries. *Open Forum Infect. Dis.* 2021;8(7):ofab159. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab159>
4. Li Y., Wang X., Blau D.M., et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10340):2047–64. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00478-0)
5. Nair H., Nokes D.J., Gessner B.D., et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010;375(9725):1545–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60206-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1)
6. Borchers A.T., Chang C., Gershwin M.E., Gershwin L.J. Respiratory syncytial virus – a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013;45(3):331–79. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>
7. Welliver R.C. Sr., Checchia P.A., Bauman J.H., et al. Fatality rates in published reports of RSV hospitalizations among high-risk and otherwise healthy children. *Curr. Med. Res. Opin.* 2010;26(9):2175–81. DOI: <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.505126>
8. Simoes E.A., Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2003;22(2 Suppl.):S13–20. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000053881.47279.d9>
9. Shi T., McAllister D.A., O'Brien K.L., et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet.* 2017;390(10098):946–58. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
10. Caini S., Stolyarov K., Sominina A., et al. A comparative analysis of the epidemiology of influenza and respiratory syncytial virus in Russia, 2013/14 to 2018/19. *J. Glob. Health.* 2022;12:04009. DOI: <https://doi.org/10.7189/jogh.12.04009>
11. Wiseman D.J., Thwaites R.S., Drysdale S.B., et al. Immunological and inflammatory biomarkers of susceptibility and severity in adult respiratory syncytial virus infections. *J. Infect. Dis.* 2020;222(Suppl. 7):S584–91. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa063>
12. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics.* 2014;134(2):e620–38. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1666>
13. Hammit L.L., Dagan R., Yuan Y., et al. Nirsevimab for prevention of RSV in healthy late-preterm and term infants. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(9):837–46. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110275>
14. Griffin M.P., Yuan Y., Takas T., et al. Single-dose nirsevimab for prevention of RSV in preterm infants. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(5):415–25. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913556>
15. Venkatesan P. Nirsevimab: a promising therapy for RSV. *Lancet Microbe.* 2022;3(5):e335. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00097-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00097-0)
16. Khan A.A., Pierre V. Dosage regimens for and compositions including anti-RSV antibodies. U.S. Patent № 12.024.553; 2024.
17. Johnson S., Oliver C., Prince G.A., et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1997;176(5):1215–24. DOI: <https://doi.org/10.1086/514115>
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
19. Candiano G., Bruschi M., Musante L., et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004;25(9):1327–33. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200305844>
20. Кривичкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В. и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. *Биотехнология.* 2016;32(1):6–75. Krivitskaya V.Z., Petrova E.R., Sorokin E.V., et al. Design and characteristics of monoclonal antibodies specific to respiratory syncytial virus. *Biotechnology.* 2016;32(1):6–75. DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2016-1-65-75> EDN: <https://elibrary.ru/vvzktst>
21. Bland M. *An Introduction to Medical Statistics.* Oxford; 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00362-017-0925-5>
22. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2024;gkae1010. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
23. Wilkins D., Yuan Y., Chang Y., et al. Durability of neutralizing RSV antibodies following nirsevimab administration and elicitation of the natural immune response to RSV infection in infants. *Nat. Med.* 2023; 29(5): 1172–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02316-5>
24. Assad Z., Romain A.S., Aupiais C., et al. Nirsevimab and Hospitalization for RSV Bronchiolitis. *N. Engl. J. Med.*

- 2024;391(2):144–54.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2314885>
25. Mazur N.L., Terstappen J., Baral R., et al. Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. *Lancet Infect. Dis.* 2023;23(1):e2–21. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00291-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00291-2)
 26. McLellan J.S., Chen M., Leung S., et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science.* 2013;340(6136):1113–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1234914>
 27. Krarup A., Truan D., Furmanova-Hollenstein P., et al. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nat. Commun.* 2015;6:8143. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms9143>
 28. Griffin M.P., Khan A.A., Esser M.T., et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI8897, the respiratory syncytial virus prefusion f-targeting monoclonal antibody with an extended half-life, in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017;61(3):e01714-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01714-16>
 29. Zhu Q., McLellan J.S., Kallewaard N.L., et al. A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(388):eaaj1928. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1928>
 30. Wilkins D., Langedijk A.C., Lebbink R.J., et al. Nirsevimab binding-site conservation in respiratory syncytial virus fusion glycoprotein worldwide between 1956 and 2021: an analysis of observational study sequencing data. *Lancet Infect. Dis.* 2023;23(7):856–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00062-2)
 31. Haryadi R., Ho S., Kok Y.J., et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116878. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>
 32. Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(2):857–72. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/12.2.857>
 33. Anderson L.J., Hierholzer J.C., Bingham P.G., Stone Y.O. Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1985;22(6):1050–2. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.1050-1052.1985>
 34. Zielinska E., Liu D., Wu H.Y., et al. Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis. *Viol. J.* 2005;2:84. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-84>
 35. van Remmerden Y., Xu F., van Eldik M., et al. An improved respiratory syncytial virus neutralization assay based on the detection of green fluorescent protein expression and automated plaque counting. *Viol. J.* 2012;9:253. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-253>
 36. Rubino K.L., Nicholas J.A. A novel, spectrophotometric microneutralization assay for respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods.* 1992;39(1-2):55–67. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90125-W](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90125-W)
 37. Cheng X., Munoz M.G., Zhou H., Jin H. Expression of beta-galactosidase by recombinant respiratory syncytial viruses for microneutralization assay. *J. Virol. Methods.* 2002;105(2):287–96. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00122-2)
 38. Zhu Q., McAuliffe J.M., Patel N.K., et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J. Infect. Dis.* 2011;203(5):674–82. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq1100>
 39. Wu H., Pfarr D.S., Tang Y., et al. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J. Mol. Biol.* 2005;350(1):126–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.049>
 40. Bates J.T., Keefer C.J., Slaughter J.C., et al. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology.* 2014;454-455:139–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.010>

Информация об авторах

Клотченко Сергей Анатольевич — к. б. н., зав. лаб. гриппозных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, fosfatik@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Романовская-Романько Екатерина Андреевна — к. б. н., в. н. с. лаб. векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

Плотникова Марина Александровна — к. б. н., с. н. с. лаб. векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

Пулькина Анастасия Александровна — к. б. н., с. н. с. лаб. векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8609-8093>

Шалдьян Арам Арутюнович — лаборант-исследователь лаб. генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

Балабашин Дмитрий Сергеевич — к. б. н., м. н. с. лаб. инженерии белка Института биоорганической химии имени М.М. Шемьякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7627-0600>

Топорова Виктория Александровна — н. с. лаб. инженерии белка Института биоорганической химии имени М.М. Шемьякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; лаборант-исследователь лаб. гриппозных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

Алиев Теймур Кантамирович — к. х. н., зам. рук. Центра НТИ Института биоорганической химии имени М.М. Шемьякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; н. с. каф. химической

Information about the authors

Sergey A. Klotchenko — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of influenza vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, fosfatik@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of vector vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

Marina A. Plotnikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of vector vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

Anastasia A. Pulkina — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of vector vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8609-8093>

Aram A. Shaldzhyan — laboratory assistant researcher, Laboratory of gene engineering and recombinant protein expression, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

Dmitry S. Balabashin — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Laboratory protein engineering, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7627-0600>

Victoria A. Toporova — researcher, Laboratory protein engineering, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; laboratory assistant researcher; Laboratory of influenza vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

Teimur K. Aliiev — Cand. Sci. (Chem.), Deputy Head, NTI Center, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow,

энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
<https://orcid.org/0000-0002-1753-9614>

Гюлиханданова Наталья Евгеньевна — к. б. н., зам. директора по проектной работе НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;
<https://orcid.org/0000-0001-6907-0144>

Люзнов Дмитрий Анатольевич — д. м. н., профессор, директор НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия; зав. каф. инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия,
<https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Участие авторов: *Клотченко С.А.* — концептуализация, подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, написание и научное редактирование текста рукописи; *Романовская-Романко Е.А.* — проведение вирусологических исследований, обработка и анализ данных, визуализация, написание и научное редактирование текста рукописи; *Плотникова М.А.* — подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация; *Пулькина А.А.* — проведение вирусологических исследований; *Шалджян А.А.* — проведение хроматографической очистки, визуализация; *Балабашин Д.С.* — получение временного продуцента рекомбинантных антител; *Топорова В.А.* — получение генно-инженерных конструкций; *Алиев Т.К.* — концептуализация, научное редактирование текста рукописи; *Гюлиханданова Н.Е.* — общее руководство проектом, привлечение финансирования; *Люзнов Д.А.* — общее руководство проектом, привлечение финансирования, рецензирование и научное редактирование текста рукописи, окончательное утверждение версии для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 18.10.2024;
принята к публикации 23.12.2024;
опубликована 28.12.2024

Russia; researcher, Department of chemical enzymology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,
<https://orcid.org/0000-0002-1753-9614>

Natalia E. Gyulikhandanova — Cand. Sci. (Biol.), Deputy director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6907-0144>

Dmitry A. Lioznov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia; Head, Department of infectious diseases and epidemiology, First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Author contribution: *Klotchenko S.A.* — significant contribution to the concept of the work, drafting the work, the design of the work and experiment performance, data analysis and interpretation of data; *Romanovskaya-Romanko E.A.* — virology experiment performance, data analysis and interpretation of data, visualization, drafting the work; *Plotnikova M.A.* — the design of the work and experiment performance, data analysis and interpretation of data, visualization; *Pulkina A.A.* — virology experiment performance; *Shaldzhyan A.A.* — chromatographic purification, visualization; *Balabashin D.S.* — transient CHO producer obtaining; *Toporova V.A.* — receiving of plasmid vectors by genetic engineering methods; *Aliiev T.K.* — contribution to the concept of the work, drafting the work, *Gyulikhandanova N.E.* — general guidance, attract financing; *Lioznov D.A.* — general project guidance critical, attract financing, drafting the work, final approval of the version for publication. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 18.10.2024;
accepted for publication 23.12.2024;
published 30.12.2024

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/yyugtk>

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)-гидразинокарбонил]-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 гибридационно-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.

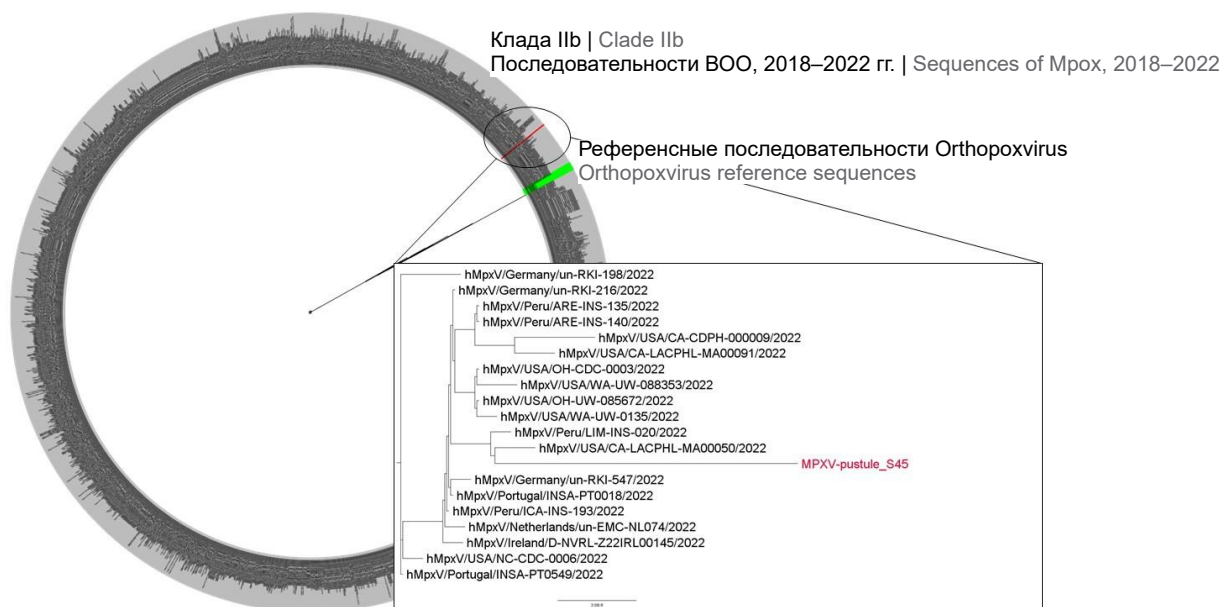


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода максимального правдоподобия.

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-

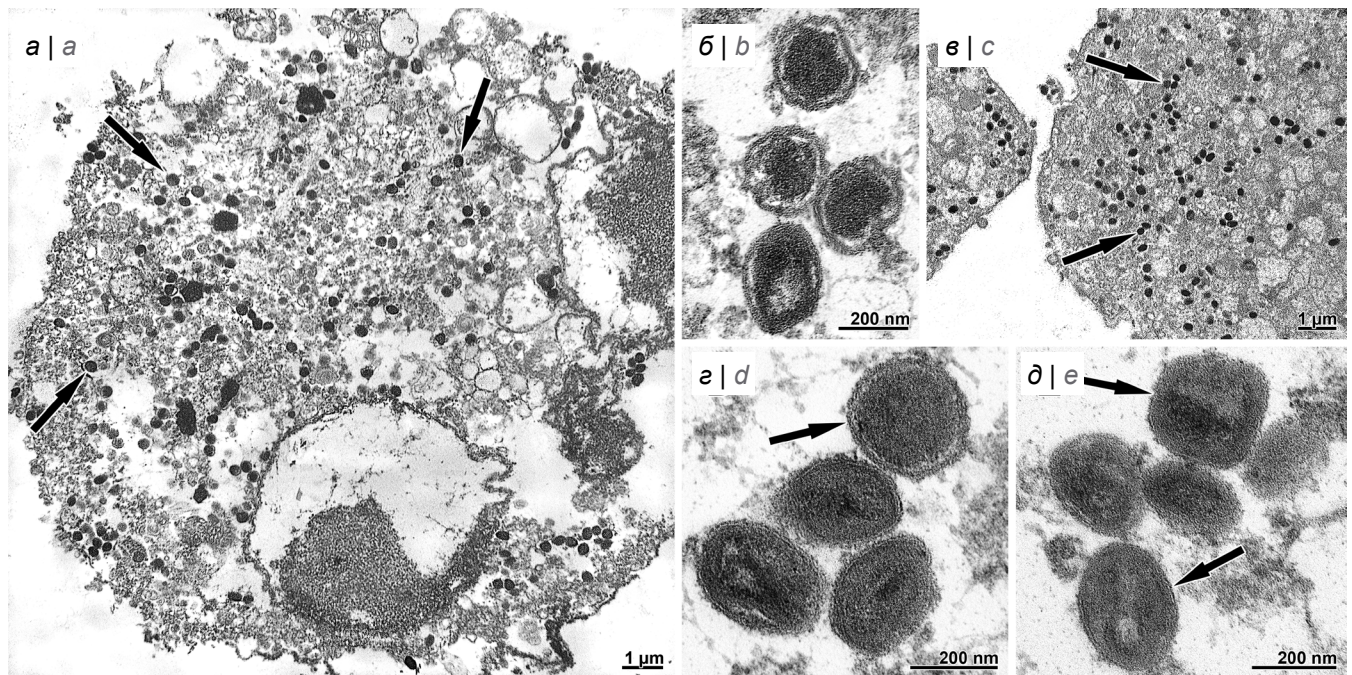


Рис. 2. Инфицированные новым штаммом St.Petersburg-22 ВОО клетки Vero E6.

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).

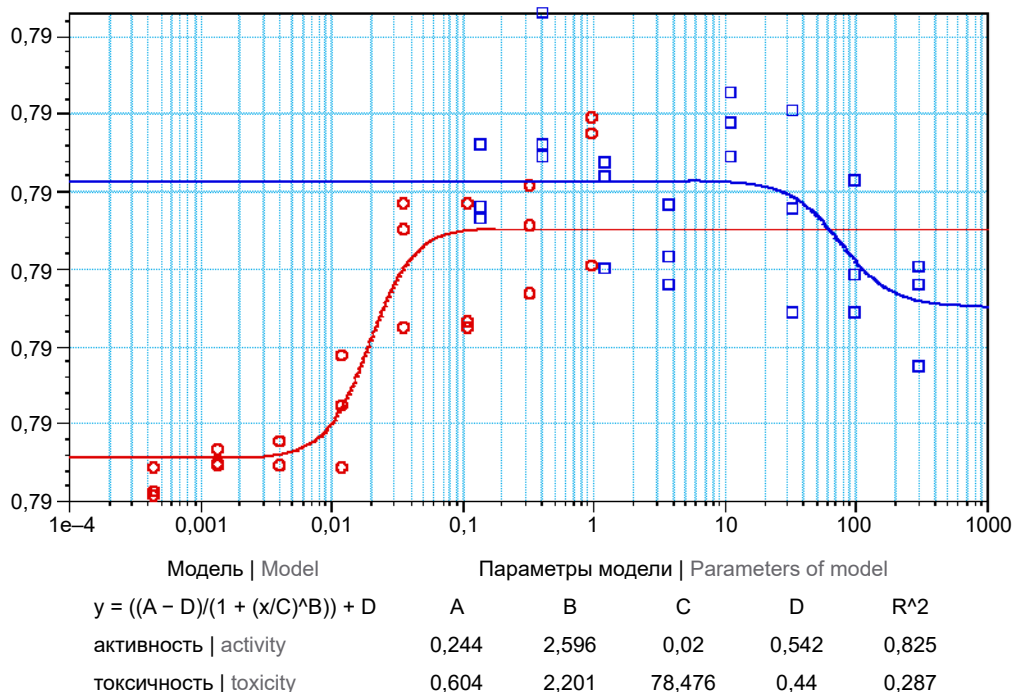


Рис. 3. Диаграмма цитотоксичности ($TC_{50} > 300$ мкг/мл) и противовирусной активности готовой лекарственной формы препарата НИОХ-14 в отношении штамма BOO St.Petersburg-22 ($IC_{50} = 0,02$ мкг/мл) в культуре клеток Vero E6 (программа «SoftMax 4.0»).

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 $5 \lg$ ТЦД₅₀/мл [21]. BOO, выделенный из биологических образцов, полученных от первого в России пациента с оспой обезьян, при культивировании в культуре клеток Vero достигал титра $5,9 \lg$ БОЕ/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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-607>



Патогенный потенциал орнитогенных штаммов *Escherichia coli*, выявленных в полярных регионах Земли

Асланов Б.И.¹, Азаров Д.В.^{1,2}, Макарова М.А.^{1,3}, Марышева Е.Г.⁴, Краева Л.А.³, Мохов А.С.¹, Лебедева Е.А.¹, Гончаров Н.Е.³, Лебедева Н.В.⁵, Стариков Д.А.⁶, Колодживева В.В.¹, Полев Д.Е.³, Гончаров А.Е.^{1,2✉}

¹Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Мурманский морской биологический институт, Мурманск, Россия;

⁶Нижне-Свирский государственный природный заповедник, Лодейное Поле, Россия

Аннотация

Введение. Патогенные штаммы *Escherichia coli* являются важным объектом мониторинга в природе, сельском хозяйстве и человеческом обществе в рамках концепции «Единого здоровья». Колонии мигрирующих птиц и птичьих базары в высоких широтах могут быть точками активных внутривидовых и межвидовых контактов между различными видами животных, сопровождающихся распространением микроорганизмов. В то же время филогеография *E. coli* в контексте наличия природных очагов колибактериозов в полярных регионах практически не изучалась.

Цель работы: оценка патогенного потенциала штаммов *E. coli*, распространённых в полярных регионах Земли, на основе анализа геномов данных бактерий из выборки, характеризующей типичные орнитогенные экосистемы Арктики и Антарктики.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы *E. coli*, выделенные из орнитогенного биологического материала в ходе экспедиций на высокоширотные территории Арктики (архипелаги Новая Земля, Земля Франца-Иосифа, Шпицберген) и Антарктики (архипелаг Хасуэлл). Из них 16 штаммов, ассоциированных с птицами (12 полярных штаммов и 4 штамма, выделенных в умеренных широтах), были отобраны для полногеномного секвенирования с использованием технологии BGI. Аннотирование геномов было сфокусировано на идентификации генов, кодирующих факторы патогенности и устойчивости к антимикробным препаратам, а также на определении принадлежности штаммов к отдельным серотипам и генетическим линиям, в том числе на основе использования метода sgMLST.

Результаты. Проведённое аннотирование геномов *E. coli* позволило установить их принадлежность к различным сиквенс-типам в схемах мультилокусного секвенирования-типирования и полногеномного секвенирования-типирования. Анализ географического распространения сиквенс-типов «полярных» штаммов *E. coli*, определённых методом sgMLST, продемонстрировал их глобальную представленность. Так, например, sgST 133718 был отмечен в Антарктиде (штамм 17_1мур) и ранее — в Великобритании, а сиквенс-тип 11903, к которому принадлежал штамм 32-1 из самой северной точки Новой Земли, был ранее выявлен в США. Все изученные штаммы характеризовались наличием обширного вирулома. В числе выявленных генов факторов патогенности обнаружены гены гемолизина А, Е, F, сидерофоры, включая иерсиниабактериальный кластер генов, ряд генов факторов адгезии, колонизации и инвазии, а также ген термостабильного энтеротоксина EAST-1 и гены, маркирующие энтероагрегативные штаммы *E. coli*: ген регулятора вирулентности *eilA* и энтероагрегативный белок (*air*). Один из «арктических» штаммов (33-1) характеризовался наличием детерминант устойчивости к антибиотикам, в частности, в его геноме был детектирован ген бета-лактамазы расширенного спектра TEM-1b и транспозон Tn1721, включающий гены устойчивости к тетрациклину (*tetA-tetR*).

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о циркуляции в орнитогенных экосистемах высокоширотной Арктики и Антарктики штаммов *E. coli*, обладающих выраженным патогенным потенциалом. Анализ геномных данных свидетельствует о распространении в этих регионах генетических линий, широко географически представленных, что обосновывает значимость мониторинга эпидемических клонов кишечной палочки, наряду с мониторингом других патогенов, в колониях массовых видов птиц на высокоширотных территориях.

Ключевые слова: Арктика, Антарктика, *Escherichia coli*, полногеномное секвенирование, факторы патогенности, орнитогенные экосистемы

Этическое утверждение. Процедура отбора образцов биологического материала осуществлялась в соответствии с общепринятыми нормами биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол №3 от 13.03.2024).

Благодарность. Коллектив авторов выражает признательность руководству и сотрудникам Российской антарктической экспедиции, экспедиции «Арктический плавучий университет», Российской арктической экспедиции на архипелаге Шпицберген, руководству Мурманского морского биологического института Российской академии наук за помощь в проведении полевых исследований.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-25-00128, <https://rscf.ru/project/23-25-00128>

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

Для цитирования: Асланов Б.И., Азаров Д.В., Макарова М.А., Марышева Е.Г., Краева Л.А., Мохов А.С., Лебедева Е.А., Гончаров Н.Е., Лебедева Н.В., Стариков Д.А., Колодживева В.В., Полев Д.Е., Гончаров А.Е. Патогенный потенциал орнитогенных штаммов *Escherichia coli*, выявленных в полярных регионах Земли. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):758–768.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-607>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-607>

Pathogenic potential of ornithogenic *Escherichia coli* strains detected in the Earth's polar regions

Batyrbek I. Aslanov¹, Daniil V. Azarov^{1,2}, Maria A. Makarova^{1,3}, Elizaveta G. Marysheva⁴, Lyudmila A. Kraeva³, Aleksey S. Mokhov¹, Ekaterina A. Lebedeva¹, Nikita E. Goncharov³, Natalya V. Lebedeva⁵, Dmitry A. Starikov⁶, Victoria V. Kolodzhiveva¹, Dmitry E. Polev³, Artemy E. Goncharov^{1, 2✉}

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

³Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia;

⁴Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

⁵Murmansk Marine Biological Institute, Murmansk, Russia;

⁶Nizhne-Svirsky State Nature Reserve, Lodeynoye Pole, Russia

Abstract

Introduction. Pathogenic strains of *Escherichia coli* are an important object of surveillance within the One Health concept in the wild, agriculture and human society.

Migratory bird colonies and high latitude avian colonies may be points of active intraspecies and interspecies contact between different animal species, accompanied by the spread of pathogens. At the same time, the phylogeography of *E. coli* in relation to the presence of natural foci of colibacillosis in polar regions remains virtually unstudied.

The aim of this study was to assess the pathogenic potential of *E. coli* strains from the polar regions of the Earth, based on the analysis of the genomes of these bacteria from typical ornithogenic ecosystems of the Arctic and Antarctic.

Materials and methods. The study used collections of *E. coli* isolated from ornithogenic biological material during expeditions to high latitude areas of the Arctic (archipelagos of Novaya Zemlya, Franz Josef Land, Svalbard) and Antarctic (Haswell Archipelago). 16 cultures associated with avian *E. coli* (12 polar and 4 temperate strains) were selected for genome-wide sequencing using BGI technology. The annotation of the genomes focused on the identification of genes for pathogenicity factors and antimicrobial resistance, as well as the identification of strains belonging to individual genetic lineages using the cgMLST method.

Results. The annotation of the genomes allowed their assignment to different sequence types in the multilocus sequencing typing and genome-wide sequencing typing schemes. The analysis of the geographical distribution of the sequence types of polar *E. coli* strains determined by the cgMLST method showed their global representation in geographically distant regions of the planet. For example, cgST 133718 was observed in Antarctica (strain 17_1myr) and in the UK, and sequence 11903, to which strain 32-1 from the northernmost point of Novaya Zemlya belonged, was previously identified in the USA.

All strains studied were characterized by the presence of extensive virulence. Among the pathogenicity factors identified were haemolysins A, E, F, siderophores, including the yersiniabactin gene cluster, a number of adhesion, colonization and invasion factors, as well as the thermostable enterotoxin EAST-1 and genes that characterize enteroaggregative strains of *E. coli* (the virulence regulator gene *eilA* and enteroaggregative protein (air)). One of the Arctic strains (33-1) had determinants of antibiotic resistance, in particular the extended-spectrum beta-lactamase gene TEM-1b and the Tn1721 transposon, including tetracycline resistance genes (tetA-TetR), were

detected in its genome.

Conclusion. The results of the study indicate the circulation of *E. coli* strains with strong pathogenic potential in high-latitude Arctic and Antarctic ornithogenic ecosystems. The analysis of genomic data indicates the presence of geographically widespread genetic lineages in these regions, which justifies the importance of monitoring epidemic clones of *E. coli*, along with monitoring for other pathogens, in bird colonies in high-latitude areas.

Keywords: Arctic, Antarctica, *Escherichia coli*, genome sequencing, pathogenicity factors, ornithogenic ecosystems

Ethics approval. The procedure of biological material sampling was carried out in accordance with generally accepted ethical norms. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the which is confirmed by the decision of the Local Ethics Committee of the North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Protocol No. 3, March 13, 2024).

Acknowledgement. The authors would like to thank the leadership and staff of the Russian Antarctic Expedition, the Arctic Floating University Expedition, the Russian Arctic Expedition to the Spitsbergen Archipelago, and the leadership of the Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences for assistance with field research.

Funding source. This study was supported by the Russian Science Foundation under grant № 23-25-00128, <https://rscf.ru/project/23-25-00128>

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

For citation: Aslanov B.I., Azarov D.V., Makarova M.A., Marysheva E.G., Kraeva L.A., Mokhov A.S., Lebedeva E.A., Goncharov N.E., Lebedeva N.V., Starikov D.A., Kolodzhiveva V.V., Polev D.E., Goncharov A.E. Pathogenic potential of ornithogenic *Escherichia coli* strains detected in the Earth's polar regions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):758–768.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-607>
EDN: <https://www.elibrary.ru/wtwuja>

Введение

Escherichia coli является уникальным микроорганизмом, способным вызвать инфекции в широком спектре клинических проявлений у человека и различных животных, что определяет значимость мониторинга распространения основных его патотипов в природе, сельском хозяйстве и человеческом обществе [1].

Одним из таких мониторируемых в рамках концепции «Единого здоровья» патотипов является птичья патогенная *E. coli* (avian pathogenic *E. coli* — АРЕС), относящаяся к группе возбудителей заболеваний внекишечной локализации (extraintestinal pathogenic *E. coli* — ЕхРЕС) [2, 3].

Несмотря на то что возможность прямой зоонозной передачи АРЕС от птиц человеку является дискутабельной [4], многочисленные исследования показывают, что АРЕС генетически сходны с человеческими ЕхРЕС (уропатогенными эшерихиями (УРЕС) и эшерихиями, ассоциированными с менингитом новорождённых (НМЕС)). Имеются исследования, подтверждающие общность факторов патогенности у изолятов АРЕС и ЕхРЕС человека. Например, гены вирулентности *iroN*, *traT*, *iucD*, *cvl/cva*, *ibeA*, *gimB*, *tia*, *neuC*, *kpsMTII*, *tsh*, *iss*, *sitD*, *chuA*, *fyuA*, *irp2*, *vat*, *malX* и *pic* присутствуют в геномах как АРЕС, так и УРЕС и НМЕС [5].

Схожесть вируломонов штаммов АРЕС и человеческих ЕхРЕС подчёркивает потенциальную угрозу распространения зоонозных инфекций, ассоциированных с птицами. Важно отметить, что дикие птицы могут выступать в качестве фактора, способствующего распространению ассоциированных с АРЕС генов вирулентности и устойчивости к антимикробным препаратам. Например, было показано,

что детерминанты антибиотикорезистентности могут передаваться от штаммов энтеробактерий диких гусей и лебедей к штаммам домашним птицам, а от последних — человеку [6, 7].

Приполярные области Земли представляют собой уникальную географическую среду, в которой, несмотря на экстремальные климатические условия, высокая продуктивность шельфовых морей [8] поддерживает высокий уровень биологического разнообразия фауны. Побережья Северного Ледовитого и Южного океанов в пределах континентальной Антарктики, антарктических и субантарктических архипелагов являются точками притяжения миллиардов мигрирующих птиц, значительная часть из которых совершает длительные, в том числе трансконтинентальные перелеты. Например, только палеарктическо-африканская миграционная система включает в себя 2,1 млрд мигрирующих особей [9]. Колонии мигрирующих птиц и птичьи базары в высоких широтах могут быть точками активных внутривидовых и межвидовых контактов между птицами и другими животными, сопровождающихся обменом микробиотой, включая патогенную её часть [10].

В этой связи представляются важными исследования по изучению распространения связанных с птицами патогенов в орнитогенных экосистемах, складывающихся вокруг колоний птиц на побережьях арктических и антарктических морей.

В то же время филогеография и генетические особенности такого актуального объекта эпидемиологического и эпизоотологического надзора, как *E. coli*, в полярных регионах практически не изучалась.

Цель исследования: оценка патогенного потенциала штаммов *E. coli*, распространённых в по-

лярных регионах Земли, на основе анализа геномов данных бактерий из выборки, характеризующей типичные орнитогенные экосистемы Арктики и Антарктики.

Материалы и методы

В работе были использованы коллекции штаммов *E. coli*, выделенных из орнитогенного биологического материала (помёт, погадки и тушки павших птиц, субстраты гнезд, микробные маты водоёмов, контаминируемых птичьим помётом) в ходе нескольких экспедиций.

В частности, при реализации научной программы Российской арктической экспедиции на архипелаге Шпицберген в 2018 г. было собрано 28 образцов орнитогенного материала, из которого были выделены 6 изолятов, в экспедиции «Арктический плавучий университет» (2023 г.) — 8 изолятов из 38 образцов, в 68-й Российской антарктической экспедиции (2022–2023 гг.) — 19 изолятов из 29 образцов.

В настоящей работе описаны культуры *E. coli*, выделенные на птичьих базарах архипелага Шпицберген (остров Западный Шпицберген), архипелагах Новая Земля и Земля Франца-Иосифа, а также на островах архипелага Хасуэлл, ставшего благодаря многотысячным колониям пингвинов Адели и императорских пингвинов одной из ключевых орнитологических территорий Восточной Антарктики.

Кроме того, в качестве штаммов сравнения были использованы 5 штаммов *E. coli*, выделенные из клоакальных смывов в период кольцевания птиц в весенне-летний период 2023 г. на Ладожской орнитологической станции (Нижне-Свирский заповедник, урочище Гумбарицы, Ленинградская область). Все арктические и антарктические культуры были выделены без применения методов обогащения с использованием плотных питательных сред при культивировании непосредственно в полевых условиях, как было описано ранее [11]. Процедура отбора образцов биологического материала осуществлялась в соответствии с общепринятыми нормами биозтики, что подтверждено решением локального этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол № 3 от 13.03.2024)

Видовую идентификацию выделенных штаммов проводили при помощи времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на приборе «Vactoscreen» («Литех»). Масс-спектры анализировали с использованием программного обеспечения «Biotyper 3.1».

В результате случайной выборки для полногеномного секвенирования (WGS) были отобраны 16 штаммов с последующей аннотацией и оценкой патогенного потенциала. Информация об источниках культур, геномы которых были секвенированы, представлена в **табл. 1**.

Для выделения геномной ДНК использовали наборы производства «Биолабмикс». Геномное секвенирование проводили с использованием технологии BGI на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Аннотацию геномов производили с использованием сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), поиск генов лекарственной устойчивости и вирулентности — при помощи программы ABRicate v 0.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>), для чего были использованы базы данных MEGARes (<https://megares.meglab.org/amrplusplus/latest/html>, Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD 3.0.2 (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) и VFDB (<https://www.mgc.ac.cn/VFs/>).

Антигенную структуру *E. coli* определяли при помощи онлайн-инструмента SerotypeFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>). Для оценки результатов мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) использовали пепусс MLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>). Результаты WGS-типирования по коровым генам, полученные при помощи онлайн-инструмента cgMLSTFinder 1.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/cgMLSTFinder/>), сопоставляли с данными по соответствующим cgMLST-типам, депонированными в базе данных Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>), допускаемая при этом различия (показатель Max Number MisMatches) не более чем в 20 точечных полиморфизмах (SNP).

Результаты

Проведённое аннотирование геномов позволило установить их принадлежность к различным сиквенс-типам (ST) в схемах MLST- и WGS-типирования. Основные характеристики изученных геномов и номера доступа к их последовательностям представлены в **табл. 2**.

Во всех изученных геномах были идентифицированы гены, кодирующие AmpC-подобные бета-лактамазы, гиперпродукция которых обеспечивает устойчивость к цефалоспорином [12]. Кроме того, геном арктического штамма *E. coli* 33-1 характеризовался наличием плазмиды размером около 78 тыс. п. н., содержащей ген бета-лактамазы расширенного спектра TEM-1b и транспозон Tn1721, включающий гены устойчивости к тетрациклину (*tetA-tetR*). В геномах изученных микроорганизмов были обнаружены многочисленные гены факторов патогенности, ассоциированные с адгезией, инвазией, захватом железа (**табл. 3**).

Широкая представленность в геномах изучаемых штаммов генов факторов патогенности ExPEC ставит вопрос о потенциальной связи этих штаммов со случаями инфекционных заболеваний у людей.

Используя базу данных Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>), акку-

Таблица 1. Характеристика культур, использованных в исследовании**Table 1.** Characteristics of studied isolates

№ No.	Культура Isolates	Место выделения, координаты Place of isolation, coordinates	Источник выделения Source of isolation
Культуры, ассоциированные с орнитогенными экосистемами Арктики Isolates associated with bird ecosystems of the Arctic			
1	67Spits	Архипелаг Шпицберген, окрестности поселка Баренцбург, 78°03'N 14°16'E Svalbard archipelago, Barentsburg, 78°03'N 14°16'E	Фекалии моевки обыкновенной (<i>Rissa trydacyla</i>) Feces of <i>Rissa trydacyla</i>
2	70_2Spits	Архипелаг Шпицберген, Побережье залива Гренфиорд, N 78°00'36.2"N 14°18'09.7"E Svalbard archipelago, Gronfjorden Bay coast, N 78°00'36.2"N 14°18'09.7"E	Фекалии моевки обыкновенной (<i>Rissa trydacyla</i>) Feces of <i>Rissa trydacyla</i>
3	89Spits	Архипелаг Шпицберген, окрестности поселка Баренцбург, 78°03'N 14°16'E Svalbard archipelago, Barentsburg, 78°03'N 14°16'E	Фекалии гуменника короткоклювого (<i>Anser brachyrhynchus</i>) Feces of <i>Anser brachyrhynchus</i>
4	97Spits	Архипелаг Шпицберген, окрестности поселка Баренцбург, 78°03'N 14°16'E Svalbard archipelago, Barentsburg, 78°03'N 14°16'E	Субстрат гнезда гуменника короткоклювого (<i>Anser brachyrhynchus</i>) Feces of <i>Anser brachyrhynchus</i>
5	AFU_2	Югорский полуостров, мыс Белый нос, 69°36'14.7"N 60°12'08.1"E Yugorsky Peninsula, White Nose Cape, 69°36'14.7"N 60°12'08.1"E	Фекалии обыкновенной гаги (<i>Somateria mollissima</i>) Feces of <i>Somateria mollissima</i>
6	AFU_32_1	Архипелаг Новая Земля, Северный о-в, мыс Желания, 76°57'18.5"N 68°34'41.9"E Novaya Zemlya archipelago, Cape of Desire, 76°57'18.5"N 68°34'41.9"E	Фекалии белого медведя, найденные рядом с птичьим базаром, сформированным моевкой обыкновенной (<i>Rissa trydacyla</i>) Feces of polar bear near the <i>Rissa trydacyla</i> bird spot
7	AFU_33_1	Архипелаг Новая Земля, Северный о-в, мыс Желания, 76°57'18.5"N 68°34'41.9"E Novaya Zemlya archipelago, North Island, Cape of Desire, 76°57'18.5"N 68°34'41.9"E	Субстрат гнезд под птичьим базаром, сформированным моевкой обыкновенной (<i>Rissa trydacyla</i>) Nests in the bird spot of <i>Rissa trydacyla</i>
8	AFU_43_1	Архипелаг Земля Франца-Иосифа, о-в Вильчека, 79°53'41.8"N 58°44'07.2"E Franz Josef Archipelago, Wilczek Island, 79°53'41.8"N 58°44'07.2"E	Скорлупа яйца толстоклювой кайры (<i>Uria lomvia</i>) Egg shell of <i>Uria lomvia</i>
9	AFU_55_1	Архипелаг Земля Франца-Иосифа, о-ва Комсомольские (Южный остров), 80°34'48.3"N 58°32'40.2"E Franz Josef Archipelago, Komsomolskie islands (South Island), 80°34'48.3"N 58°32'40.2"E	Микробные маты во временном водоёме в месте массового скопления полярных крачек (<i>Sterna paradisaea</i>) Pond near the <i>Sterna paradisaea</i> bird spot
Культуры из орнитогенных биотопов Антарктиды Isolates associated with bird ecosystems of the Antarctic			
10	15myr	Восточная Антарктида, Земля Королевы Мэри, архипелаг Хасуэлл, остров Хасуэлл, 66°31'36.6"S 93°00'20.8"E West Antarctica, Queen Mary Land, Haswell Archipelago, Haswell Island, 66°31'36.6"S 93°00'20.8"E	Труп птенца пингвина Адели, смыв из клоаки (<i>Pygoscelis adeliae</i>) Adelie penguin (<i>Pygoscelis adeliae</i>), cloaca sample
11	17_1myr	Восточная Антарктида, Земля Королевы Мэри, архипелаг Хасуэлл, остров Хасуэлл, 66°31'36.6"S 93°00'20.8"E West Antarctica, Queen Mary Land, Haswell Archipelago, Haswell Island, 66°31'36.6"S 93°00'20.8"E	Желудочный секрет антарктического глупыша (<i>Fulmarus glacialisoides</i>) Stomach sample from <i>Fulmarus glacialisoides</i>
12	28myr	Восточная Антарктида, Земля Королевы Мэри, архипелаг Хасуэлл, остров Токарева, 66°32'06.1"S 92°58'25.8"E West Antarctica, Queen Mary Land, Haswell Archipelago, Tokareva Island, 66°32'06.1"S 92°58'25.8"E	Фекалии пингвина Адели (<i>Pygoscelis adeliae</i>) Feces of Adelie penguin (<i>Pygoscelis adeliae</i>)
Культуры от птиц Европейской части России, полученные при кольцевании птиц на Ладожской орнитологической станции (ЛОС) Isolates from birds in European region of Russia, Ladoga Ornithological Station (LOS)			
13	LOS_49	Нижне-Свирский заповедник, ЛОС, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E Nizhne-Svirskiy Reserve, LOS, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E	Черноголовая гаичка (<i>Poecile palustris</i>), смыв из клоаки Cloaca sample from <i>Poecile palustris</i>
14	LOS_51	Нижне-Свирский заповедник ЛОС, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E Nizhne-Svirskiy Reserve, LOS, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>), фекалии <i>Anas crecca</i> feces
15	LOS_52	Нижне-Свирский заповедник, ЛОС, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E Nizhne-Svirskiy Reserve, LOS, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E	Дрозд-рябинник (<i>Turdus pilaris</i>), смыв из клоаки Cloaca sample from <i>Turdus pilaris</i>
16	LOS_54	Нижне-Свирский заповедник ЛОС, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E Nizhne-Svirskiy Reserve, LOS, 60°40'35.0"N 32°56'27.2"E	Дрозд-рябинник (<i>Turdus pilaris</i>), смыв из клоаки Cloaca sample from <i>Turdus pilaris</i>

Таблица 2. Генетические характеристики изученных штаммов *E. coli*

Table 2. Genetic characteristics of isolated *E. coli* strains

Штамм Strain	Регион выделения Region of isolation	Серотип Serotype	Сиквенс-тип (ST) Sequence type (ST)	ST по SNP в коровых генах (cgST) ST by core genome (cgST)	Номер доступа GenBank GenBank access number
67Spits	Арктика Arctic	O4:H5	12	10054	JAYEAG010000000
70_2Spits	Арктика Arctic	O43:H2	937	28072	JAYEAE000000000.1
89Spits	Арктика Arctic	O83:H1	135	87221	JAYEAD000000000.1
97Spits	Арктика Arctic	O166:H49	1246	162	JAYEAC000000000.1
AFU_2	Арктика Arctic	O93:H16	8097	132840	JAYEAJ000000000
AFU_32_1	Арктика Arctic	O54:H45	491	11903	JAYEAI000000000
AFU_33_1	Арктика Arctic	O15:H2	69	189219	JAYEАН000000000
AFU_43_1	Арктика Arctic	O9:H49	6163*	1429	JBIXQY000000000
AFU_55_1	Арктика Arctic	O39:H4	1155	196482	JBIXXZ000000000
15myr	Антарктика Antarctic	O8:H7	127	196780	JBIXXV000000000
17_1myr	Антарктика Antarctic	O6:H31	196	133718	JBIXXW000000000
28myr	Антарктика Antarctic	O182:H38	1632	94237	JBIXXX000000000
LOS_49	Европейская часть РФ European Russia	O8:H5	2594*	47119	JBIXYA000000000
LOS_51	Европейская часть РФ European Russia	O85:H8	297	114487	JBIXYB000000000
LOS_52	Европейская часть РФ European Russia	Н/и N/i	1333*	119313	JBIXYC000000000
LOS_54	Европейская часть РФ European Russia	Н/и N/i	58	126100	JBIXYD000000000

Примечание. *Генотипы, имеющие однонуклеотидные SNP в генах, по которым осуществлялось секвенирование-типирование, различающие их от указанных ST. Н/и — серотип не идентифицирован.

Note. *Genotypes with single nucleotide polymorphisms in genes for which sequencing-typing was performed, distinguishing them from the specified sequence types. N/I — not identified.

мулирующую глобальные данные о результатах cgMLST-генотипирования и включающую на данный момент информацию о более чем 340 тыс. штаммов *E. coli*, мы провели поиск информации о географическом распространении cgST, определённых в настоящем исследовании, и их источниках выделения. Искомую информацию удалось извлечь из метаданных, представленных в EnterovBase, для 11 ST (табл. 4).

Обсуждение

В нашем исследовании мы предприняли попытку сформировать выборку штаммов *E. coli*, ассоциированных с высокоширотными орнитогенными экосистемами, типичными для приполярных регионов как в Северном, так и в Южном полушарии.

В Арктике наши исследования были сфокусированы на изучении штаммов, связанных с морскими колониальными птицами (моевки, толстоклювые кайры) и представителями отряда гусеобразные (гуменник, гаги). Данные виды птиц различаются как по занимаемым экологическим нишам, так и по длительности и направлениям миграций, что может оказывать влияние на структуру их микробиоты,

определяя вероятность колонизации различными генотипами *E. coli*.

В то же время необходимо учитывать возможность формирования единого резервуара для популяций данного микроорганизма на протяжении всего побережья Северного Ледовитого океана, определяемого миграциями птиц в меридиональном направлении. Так, недавно было выяснено, что существенная часть популяции моевки мигрирует с Южного острова Новой Земли к местам зимовки на побережья северной части Тихого океана [13]. Распространение патогенов с арктическими перелётными птицами (преимущественно из отряда гусеобразных) одновременно в широтном и в меридиональном направлениях было ранее показано для вирусов гриппа [14]. Следует отметить, что гуси-гуменники, штаммы от которых были изучены в настоящем исследовании, совершают сезонные миграции с территории архипелага Шпицберген к местам зимовки в Бельгию и Нидерланды, причём на фоне глобальных изменений климата в Арктике эти птицы активно осваивают также Новую Землю [15].

Три «антарктических» штамма, геномы которых были охарактеризованы в настоящем ис-

Таблица 3. Факторы патогенности изученных штаммов *E. coli***Table 3.** Pathogenic determinants in studied *E. coli* strains

Факторы патогенности Pathogenic determinants	17myr	15myr	28myr	67Spits	70_2Spits	89Spits	97Spits	AFU_2	AFU_32_1	AFU_33_1	AFU_43_1	AFU_55_1	LOS_49	LOS_51	LOS_52	LOS_54
Гемолизины Hemolysins																
Гемолизин А (hlyA) Hemolysin A (hlyA)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Птичий гемолизин Е (hlyE) Bird hemolysin E (hlyE)	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Гемолизин F (hlyF) Hemolysin F (hlyF)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Сидерофоры Siderophores																
Энтеробактериальный оперон Enterobactin operon	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Иерсениабактериальный оперон Yersiniabactin operon	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Аэробактериальный оперон Aerobactin operon	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Токсины Toxins																
Термостабильный энтеротоксин EAST-1 Heat-stable enterotoxin EAST-1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Субтилаза Subtilase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Цитолетальные токсины набухания (cdt) Cytolethal distending toxin (cdt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Факторы адгезии, инвазии и биоплёнкообразования Adhesion, invasion and biofilm formation determinants																
Адгезин AIDA-I Adhesin AIDA-I	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Субстанция агрегации Tia Aggregation substance Tia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Гомолог гена <i>eilA</i> (<i>Salmonella</i> HilA homolog) Gen <i>eilA</i> homologue (<i>Salmonella</i> HilA homolog)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Энтероагрегативный белок (air) Enterocaggregative protein (air)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Фактор инвазии в эндотелий мозга (ibeA) Factor of invasion of brain endothelium (ibeA)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Фактор выживания в сыворотке (iss) Serum survival gene (iss)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Арисульфатаза AsIA Arylsulfatase AsIA	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Термостабильный агглютинин (hra) Heat-resistant agglutinin (hra)	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Цитотоксический некротизирующий фактор 1 (cnf) Cytotoxic necrotizing factor (cnf)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Белок уропатогенности (usp) Uropathogenic specific protein (usp)	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Курлин CsgA Curlin CsgA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Гомолог гена <i>shlA</i> в острове патогенности <i>Shigella flexneri</i> SHI-2 Homologue of the <i>Shigella flexneri</i> SHI-2 pathogenicity island gene <i>shlA</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Интимино-подобный адгезин FdeC Intimin-like adhesin FdeC	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Энтеробактериальный транспортер сериновой протеазы (SPATE) vat Serine protease autotransporters of <i>Enterobacteriaceae</i> (SPATE)	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-

Таблица 4. Географическое распространение и источники выделения штаммов cgST, выявленных в настоящем исследовании

Table 4. Geographical distribution and isolation sources of sequence types (cgST) of the identified strains

Сиквенс-тип по SNP в коровых генах (cgST) Sequence type by core genome (cgST)	Регион (регионы) идентификации Region (regions) of isolation	Источник выделения Source of isolation	Ссылка на номер архивов коротких последовательностей/ <i>Sequence Read Archive (SRA)</i> , соответствующих штаммам, идентичным или наиболее близким к выявленным ST Reference number of the Sequence Read Archive (SRA) for strains most similar to the identified STs
10054	Европа, Аландские острова Europe, Anand Islands	Человек (гемокультура) Human (blood culture)	ERR434967
28072	США USA	Сельскохозяйственные животные (коровы) Livestock (cows)	SRR3972294
162	Австралия Australia	Австралийская чайка <i>Chroicocephalus novaehollandiae</i>	SRR24017969
132840	США USA	Телята Livestock (calves)	SRR26082289
11903	США USA	Человек (пациент с инфекцией мочевыводящих путей) Human (patient with urinary tract infection)	SRR1314409
189219	США, Испания, Бразилия, Дания, Великобритания USA, Spain, Brazil, Denmark, UK	Цыплята, человек (гемокультуры и моча при инфекции мочевыводящих путей) Chicken, human (blood culture and urine during urinary tract infection)	SRR17774295, ERR13306341, ERR4014451, SRR21849316, SRR21846782
196780	США USA	Коровы Livestock (cows)	SRR19171807
133718	Великобритания UK	Дикие птицы (Anseriformes) Wild birds (Anseriformes)	SRR11410512
114487	США USA	Говядина Beef	SRR10156198
119313	Нидерланды Netherlands	Человек (гемокультура) Human (blood culture)	ERR3650458
126100	Швеция Sweden	Сельскохозяйственные птицы Poultry	SRR14477383

следовании, выделены на территории колоний пингвинов Адели на островах архипелага Хасуэлл в Восточной Антарктиде. Несмотря на то что пингвины данного вида являются эндемичным для Антарктиды видом, на территориях колоний они соседствуют в том числе с дальнеперелётными видами птиц. Например, частый обитатель архипелага Хасуэлл — южнополярный поморник, способен совершать дальние сезонные миграции и достигать Северной Пацифики и Северной Атлантики [16]. Популяции антарктических птиц не являются, таким образом, изолированными от глобальной циркуляции патогенов, о чем, в частности, свидетельствует циркуляция в Антарктике штаммов вирусов гриппа, идентичных выделенным в других географических регионах [17].

Анализ географического распространения ST *E. coli*, определённых методом cgMLST, продемонстрировал их космополитизм, что проявлялось выявлением идентичных cgST в географически дистантных регионах планеты. Так, например, cgST 133718 был отмечен в Антарктиде (штамм 17_1myr) и в Великобритании, а cgST 11903, к которому при-

надлежал штамм 32-1 из самой северной точки Новой Земли, был ранее выявлен в США.

Несмотря на то что все изученные штаммы относятся к разным генетическим линиям (ST и серотипам), их объединяет наличие обширного вирулума. Как видно из данных табл. 3, все штаммы из полярных регионов располагают совокупностью факторов вирулентности, позволяющих рассматривать их в качестве потенциальных возбудителей инфекций человека. В этом они в целом не отличаются от штаммов, выделенных от птиц в Ленинградской области.

Так, 10 из 12 «полярных» штаммов содержали гены или сочетания генов, детерминирующих синтез гемолизина А, Е, F, которые совместно с сидерофорами энтеробактериального, аэробактериального и иерсинибактериального кластера принимают участие в захвате железа в ходе инфекционного процесса [18]. Необходимо отметить, что гены иерсинибактериального оперона, обнаруженные у половины «арктических» и «антарктических» культур, входят в состав острова высокой патогенности. Данный мобильный генетический элемент ассоциирован, как было показано ранее, с вирулентными UPEC [19].

К выявленным факторам вирулентности, для которых описана локализация на мобильных генетических элементах, относится белок уропатогенности. Продемонстрировано значение данного фактора в повреждении клеток млекопитающих, что имеет существенное значение в развитии инфекций мочевыводящих путей [20].

В изученной выборке также выявлены штаммы, маркирующие энтероаггративный патотип (EAEC) *E. coli*, в частности, в геномах штаммов AFU_33_1 и AFU_43_1 с Новой Земли и Земли Франца-Иосифа обнаруживаются распространённые у EAEC ген регулятора вирулентности *eilA* (*Salmonella* HiaA homolog) и ген энтероаггративного белка (*air*). Штамм AFU_33_1, по результатам cgMLST, принадлежит к ST 189219, который широко представлен в ряде европейских стран, США и Бразилии в качестве возбудителя генерализованных инфекций человека. Таким образом, мы фактически наблюдали распространение своеобразного эпидемического клона *E. coli* на территориях, где отсутствуют постоянные поселения человека.

В целом распространение глобальных генетических линий *E. coli* в высоких широтах соответствует представлениям о том, что в отношении патогенов человека соблюдается «Правило Рапопорта», заключающееся в том, что по мере перемещения от экватора к полюсам ареалы распространения видов или иных таксономических группировок увеличиваются [21].

Проведённый в нашей работе поиск генов устойчивости к антимикробным препаратам в геномах штаммов *E. coli* свидетельствует об отсутствии (в пределах нашей выборки) критических детерминант лекарственной устойчивости. Тем не менее наличие генетических детерминант устойчивости к цефалоспорином и тетрациклину в составе генома арктического штамма AFU_33_1 свидетельствует о возможности циркуляции несущих эти гены мобильных генетических элементов в «дикий природе» и их сохранении в составе микробиома арктических животных при отсутствии пресса антибиотиков.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о циркуляции в орнитогенных экосистемах высокоширотной Арктики и Антарктики штаммов *E. coli*, обладающих выраженным патогенным потенциалом. Анализ геномных данных свидетельствует о присутствии в этих регионах генетических линий, широко распространённых географически, что обосновывает значимость мониторинга эпидемических клонов *E. coli*, наряду с мониторингом других патогенов, в колониях птиц на высокоширотных территориях.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- García A., Fox J.G. A one health perspective for defining and deciphering *Escherichia coli* pathogenic potential in multiple hosts. *Comp. Med.* 2021; 71(1):3–45.
DOI: <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-20-000054>
- Kimura A.H., Koga V.L., de Souza Gazal L.E., et al. Characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli*: an outbreak in canaries. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52(2):1005–12.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00443-0>
- Dalazen G., Fuentes-Castillo D., Pedroso L.G., et al. CTX-M-producing *Escherichia coli* ST602 carrying a wide resistome in South American wild birds: another pandemic clone of one health concern. *One Health.* 2023;17:100586.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100586>
- Yousef H.M.Y., Hashad M.E., Osman K.M., et al. Surveillance of *Escherichia coli* in different types of chicken and duck hatcheries: one health outlook. *Poult. Sci.* 2023; 102(12):103108.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103108>
- Ewers C., Li G., Wilking H., Kiessling S., et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 2007;297(3):163–76.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.003>
- Medvecky M., Papagiannitsis C.C., Wyrsh E.R., et al. Interspecies transmission of CMY-2-Producing *Escherichia coli* sequence type 963 isolates between humans and gulls in Australia. *mSphere.* 2022;7(4):e0023822.
DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00238-22>
- Fu B., Xu J., Yin D., et al. Transmission of bla_{NDM} in Enterobacteriaceae among animals, food and human. *Emerg. Microbes Infect.* 2024;13(1):2337678.
DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2337678>
- Arrigo K.R., Thomas D. Large scale importance of sea ice biology in the Southern Ocean. *Antarct. Sci.* 2004;16(4):471–86.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102004002263>
- Hahn S., Bauer S., Liechti F. The natural link between Europe and Africa – 2.1 billion birds on migration. *Oikos.* 2009; 118:624–6.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17309.x>
- Günther A., Krone O., Svansson V., et al. Iceland as stepping stone for spread of highly pathogenic avian influenza virus between Europe and north America. *Emerg. Infect. Dis.* 2022; 28(12):2383–8.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2812.221086>
- Асланов Б.И., Гончаров А.Е., Азаров Д.В. и др. Характеристики геномов условно-патогенных бактерий зоогенных экосистем островов Западной Арктики. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО.* 2024;32(6):81–8. Aslanov B.I., Goncharov A.E., Azarov D.V., et al. Characteristics of genomes of opportunistic bacteria in zoogenic ecosystems of the Russian Western Arctic Islands. *Public Health and Life Environment – PH&LE.* 2024;32(6):81–8.
DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2024-32-6-81-88>
EDN: <https://elibrary.ru/gzgyzpzp>
- Maillard A., Delory T., Bernier J., et al. Treatment of AmpC-producing Enterobacteriales Study Group. Effectiveness of third-generation cephalosporins or piperacillin compared with cefepime or carbapenems for severe infections caused by wild-type AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriales: A multi-centre retrospective propensity-weighted study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2023;62(1):106809.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106809>
- Ezhov A.V., Gavrilov M.V., Krasnov Y.V., et al. Transpolar and bi-directional migration strategies of black-legged kittiwakes *Rissa tridactyla* from a colony in Novaya Zemlya, Barents Sea, Russia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2021;676:189–203.
DOI: <https://doi.org/10.3354/meps13889>

14. Gass J.D. Jr., Dusek R.J., Hall J.S., et al. Global dissemination of influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones. *Mol. Ecol.* 2023;32(1):198–213. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.16738>
15. Madsen J., Schreven K.H.T., Jensen G.H., et al. Rapid formation of new migration route and breeding area by Arctic geese. *Curr. Biol.* 2023;33(6):1162–70.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.065>
16. Shick S.R.A., Elrod M.L., Schmidt A., et al. Genomes of Single-Stranded DNA Viruses in a Fecal Sample from South Polar Skua (*Stercorarius macconnicki*) on Ross Island, Antarctica. *Microbiol. Resour. Announc.* 2023;12(6):e0029923. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.00299-23>
17. Охлопкова О.В., Гончаров А.Е., Асланов Б.И. и др. Первое обнаружение вирусов гриппа А субтипов H1N1 и H3N8 в Антарктическом регионе: о. Кинг-Джордж, 2023 год. *Вопросы вирусологии.* 2024;69(4):377–89. Ohlopkova O.V., Goncharov A.E., Aslanov B.I., et al. First detection of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N8 in the Antarctic region: King George Island, 2023. *Problems of Virology.* 2024;69(4):377–89. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-257> EDN: <https://elibrary.ru/qujzfv>
18. Wallace A.J., Stillman T.J., Atkins A., et al. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell.* 2000;100(2):265–76. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81564-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81564-0)
19. Katumba G.L., Tran H., Henderson J.P. The Yersinia high-pathogenicity island encodes a siderophore-dependent copper response system in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 2022;13(1):e0239121. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.02391-21>
20. Lloyd A.L., Rasko D.A., Mobley H.L. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2007;189:3532–46. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01744-06>
21. Guernier V., Guégan J.F. May Rapoport's rule apply to human associated pathogens? *Ecohealth.* 2009;6(4):509–21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0290-5>

Информация об авторах

Асланов Батырбек Исметович — д. м. н., зав. каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Азаров Даниил Валерьевич — к. м. н., зав. лаб. инновационных методов микробиологического мониторинга НОЦ НЦМУ Центр персонализированной медицины Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2483-5144>

Макарова Мария Александровна — д. м. н., в. н. с., зав. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент каф. медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Марышева Елизавета Георгиевна — студент биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-8241-5290>

Краева Людмила Александровна — д. м. н., профессор, зав. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9115-3250>

Мохов Алексей Сергеевич — к. м. н., ассистент каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1519-5299>

Лебедева Екатерина Андреевна — к. м. н., ассистент каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, с. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9547-0192>

Гончаров Никита Евгеньевич — м. н. с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6097-5091>

Лебедева Наталья Викторовна — д. б. н., профессор, г. н. с. лаб. орнитологии и паразитологии Мурманского морского биологического института, Мурманск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3545-753X>

Стариков Дмитрий Александрович — к. б. н., зам. директора по науке Нижне-Свирского государственного природного заповедника, Лодейное Поле, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3721-8615>

Колодзиева Виктория Васильевна — к. м. н., доцент каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, с. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Information about the authors

Batyrbek I. Aslanov — D. Sci. (Med.), Head, Department of epidemiology, parasitology and disinfection, Head, Laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Daniil V. Azarov — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of innovative methods of microbiological monitoring, Scientific and Educational Center of the National Center of Medical Sciences, Center for Personalized Medicine, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2483-5144>

Maria A. Makarova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Laboratory of intestinal infections, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia; Associate Professor, Department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, 191015, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Elizaveta G. Marysheva — student, Faculty of biology and soil science, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-8241-5290>

Lyudmila A. Kraeva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9115-3250>

Aleksey S. Mokhov — Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of epidemiology, parasitology and disinfection, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1519-5299>

Ekaterina A. Lebedeva — Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Department of epidemiology, parasitology and disinfection, senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9547-0192>

Nikita E. Goncharov — junior researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6097-5091>

Natalya V. Lebedeva — D. Sci. (Biol.), Professor, chief researcher, Laboratory of ornithology and parasitology, Murmansk Marine Biological Institute, Murmansk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3545-753X>

Dmitry A. Starikov — Cand. Sci. (Biol.), deputy director for science, Nizhne-Svirsky State Nature Reserve, Lodeynoye Pole, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3721-8615>

Victoria V. Kolodzieva — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of epidemiology, parasitology and disinfection, senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage

кулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1537-211X>

Полев Дмитрий Евгеньевич — к. б. н., с. н. с. группы метагеномных исследований отдела эпидемиологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9679-2791>

Гончаров Артемий Евгеньевич[✉] — д. м. н., зав. лаб. функциональной геномики и протеомики микроорганизмов Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, в. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, phage1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Участие авторов: *Асланов Б.И.* — методология и дизайн исследования, редактирование рукописи; *Азаров Д.В.* — обработка геномных данных; *Макарова М.А.* — редактирование рукописи; *Марышева Е.Г., Краева Л.А., Лебедева Е.А., Колоджиева В.В.* — обработка материала; *Гончаров Н.Е., Полев Д.Е.* — геномное секвенирование; *Лебедева Н.В., Стариков Д.А.* — сбор биологического материала; *Гончаров А.Е.* — методология и дизайн исследования, сбор биологического материала, организация обработки биологического материала, написание и редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2024;
принята к публикации 21.12.2024;
опубликована 28.12.2024

research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1537-211X>

Dmitry E. Polev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Metagenomic research group, Epidemiology department, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9679-2791>

Artemy E. Goncharov[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of functional genomics and proteomics of microorganisms, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of Epidemiology, parasitology and disinfection, leading researcher, Laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, phage1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Author contribution: *Aslanov B.I.* — methodology and design of the study, editing of the manuscript; *Azarov D.V.* — processing of genomic data, *Makarova M.A.* — editing of the manuscript; *Marysheva E.G., Kraeva L.A., Lebedeva E.A., Kolodzhieva V.V.* — processing of the material; *Goncharov N.E., Polev D.E.* — genomic sequencing; *Lebedeva N.V., Starikov D.A.* — collection of biological material; *Goncharov A.E.* — methodology and design of research, collection of biological material, organization of processing of biological material, writing and editing of the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.10.2024;
accepted for publication 21.12.2024;
published 30.12.2024



Протективный потенциал структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите от COVID-19

Должикова И.В.[✉], Гроусова Д.М.¹, Зорков И.Д.¹, Илюхина А.А.¹, Ковыршина А.В.¹,
Зубкова О.В.¹, Попова О.Д.¹, Ожаровская Т.А.¹, Зрелкин Д.И.¹, Савина Д.М.¹,
Самохвалова Е.Г.¹, Тухватулин А.И.¹, Щепляков Д.В.¹, Логунов Д.Ю.¹, Гинцбург А.Л.^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Множество различных вакцин для профилактики COVID-19 в кратчайшие сроки получили разрешение на экстренное применение. В связи с высоким уровнем изменчивости возбудителя, важно учитывать вариабельность структурных белков вируса SARS-CoV-2 и их протективный потенциал в защите животных от COVID-19.

Цель исследования — сравнить протективный потенциал структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите животных от COVID-19.

Материалы и методы. В качестве модельных животных при исследовании вируса SARS-CoV-2 служили трансгенные мыши B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1m/J (F1). Для иммунизации животных использовали препараты рекомбинантных аденовирусных векторов: rAd5-S, rAd5-N, rAd5-M. В работе применяли различные генетические, вирусологические и иммунологические методы, а также методы работы с животными.

Результаты. Наибольшее количество аминокислотных замен в структурных белках разных вариантов SARS-CoV-2 было обнаружено в гликопротеине S, наименьшее — в нуклеопротеине N. На модели COVID-19 у животных показано, что только использование гликопротеина S в качестве антигена в составе вакцинного препарата позволяет сформировать протективный иммунитет, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, при этом использование белка N позволяет защитить 50% животных от летальной инфекции, а белок M не обладает протективным потенциалом.

Заключение. Полученные данные, а также анализ данных эпидемиологической эффективности разных мРНК- и векторных вакцин демонстрируют, что использование гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 в качестве антигена позволяет сформировать наиболее высокий уровень защиты. Учитывая постоянную смену циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2, снижение эффективности используемых вакцин с исходным антигенным составом в отношении новых вариантов вируса и сохраняющийся высокий уровень заболеваемости COVID-19, необходимо проводить непрерывный мониторинг эффективности вакцинных препаратов в отношении новых вариантов вируса и своевременно проводить актуализацию антигенного состава вакцин при выявлении снижения эффективности.

Ключевые слова: антиген, SARS-CoV-2, защитный иммунитет, COVID-19

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 24 от 21.04.2022).

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

Конфликт интересов. Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зорков И.Д., Попова О.Д., Ожаровская Т.А., Тухватулин А.И., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю. и Гинцбург А.Л. декларируют авторство патента на фармацевтическое средство на основе рекомбинантных вирусных векторов, несущих гликопротеин S вируса SARS-CoV-2, и метод его использования для профилактики COVID-19 (патент № RU 2731342 C1). Все остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зорков И.Д., Илюхина А.А., Ковыршина А.В., Зубкова О.В., Попова О.Д., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Савина Д.М., Самохвалова Е.Г., Тухватулин А.И., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Протективный потенциал структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите от COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(6):769–778.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-577>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-577>

Protective potential of structural proteins of the SARS-CoV-2 virus in protecting against COVID-19

Inna V. Dolzhikova¹✉, Daria M. Grousova¹, Ilya D. Zorkov¹, Anna A. Ilyukhina¹, Anna V. Kovyrshina¹, Olga V. Zubkova¹, Olga D. Popova¹, Tatiana A. Ozharovskaya¹, Denis I. Zrelkin¹, Daria M. Savina¹, Ekaterina G. Samokhvalova¹, Amir I. Tukhvatulin¹, Dmitry V. Shcheblyakov¹, Denis Yu. Logunov¹, Alexander L. Gintsburg^{1,2}

¹National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;

²First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Many different vaccines for the prevention of COVID-19 have received emergency use approval in the shortest possible time. Due to the high rate of variability of the pathogen, in this study we analyzed the variability of the structural proteins of the SARS-CoV-2 virus and compared their protective potential in protecting animals from COVID-19.

The aim of the study was to compare the protective potential of the SARS-CoV-2 structural proteins in protecting animals from COVID-19.

Materials and methods. The SARS-CoV-2 virus was used in the study. Transgenic mice B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J (F1) were used as model animals. Recombinant adenoviral vectors rAd5-S, rAd5-N, rAd5-M were used for immunization of animals. Various genetic, virological and immunological methods, as well as methods of working with animals, were used in the study.

Results. The largest number of amino acid substitutions in the structural proteins of different SARS-CoV-2 variants was detected in glycoprotein S, the smallest — in nucleoprotein N. In the COVID-19 animal model, it was shown that only the use of glycoprotein S as a vaccine antigen allows to form protective immunity that protects 100% of animals from a lethal infection caused by the SARS-CoV-2 virus, while the use of protein N protects 50% of animals from a lethal infection, and protein M does not have a protective potential.

Conclusion. The data obtained, as well as the analysis of the epidemiological efficacy of various mRNA and vector vaccines, demonstrate that the use of the SARS-CoV-2 glycoprotein S as an antigen allows to form the highest level of protection. Due to the constant change in circulating variants of the SARS-CoV-2 virus, the decrease in the effectiveness of the vaccines with the original antigen composition against new variants of the virus and the continuing high incidence of COVID-19, it is necessary to continuously monitor the effectiveness of vaccines against new variants of the virus and promptly update the antigen composition of vaccines when a decrease in effectiveness is detected.

Keywords: *antigen, SARS-CoV-2, protective immunity, COVID-19*

Ethical approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (Protocol No. 24 of April 21, 2022).

Source of funding. The authors declare that there was no external funding for this study.

Conflict of interest. Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Zorkov I.D., Popova O.D., Ozharovskaya T.A., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., and Gintsburg A.L. declare that they are the authors of patent for the immunobiological agent based on recombinant viral vectors carrying the S glycoprotein of the SARS-CoV-2 virus and the method of its use for the prevention of COVID-19 (Patent No. RU 2731342 C1). All authors declare no conflict of interest.

For citation: Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Zorkov I.D., Ilyukhina A.A., Kovyrshina A.V., Zubkova O.V., Popova O.D., Ozharovskaya T.A., Zrelkin D.I., Savina D.M., Samokhvalova E.G., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Protective potential of structural proteins of the SARS-CoV-2 virus in protecting against COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(6):769–778.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-577>

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

Введение

С момента идентификации возбудителя COVID-19 — вируса SARS-CoV-2 — разработка вакцин идёт беспрецедентными и необычайными

темпами благодаря совместным усилиям исследователей, промышленности и правительств разных стран. Это позволило в кратчайшие сроки получить разрешение на экстренное применение вакцин и

внедрение их в гражданский оборот для вакцинации населения по всему миру.

Вирус SARS-CoV-2 относится к одноцепочечным (+)РНК-содержащим вирусам рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*, размер генома варьирует от 29,8 до 29,9 тыс. нуклеотидов, вирионы имеют сферическую или эллипсоидальную форму со средним диаметром 108 ± 8 нм и содержат 4 основных структурных белка. Внешняя поверхность вириона покрыта поверхностным белком — гликопротеином S, наружная мембрана вируса содержит мембранный белок М и оболочечный белок Е. Внутри вириона находится рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из нуклеокапсидного белка (N) и РНК вируса [1]. Поверхностный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2 представляет собой тример с молекулярной массой около 600 кДа. Расположенный на внешней оболочке вириона, он играет критическую роль в вирусной инфекции благодаря распознаванию рецепторов и последующему слиянию мембран вируса и клетки-хозяина. Было показано, что S вызывает выраженный иммунный ответ, что делает его доминантной мишенью для разработки вакцин для профилактики COVID-19 [2–5]. Основным белковым компонентом внутри вириона является нуклеокапсидный белок N, который необходим для связывания и упаковки геномной РНК в рибонуклеопротеидный комплекс (RNP-комплекс) внутри вириона [6]. Мембранный белок коронавируса (М) является наиболее распространённым вирусным структурным белком и играет центральную роль в сборке и морфогенезе вируса [7]. Белки М и N потенциально могут служить мишенями для включения в состав кандидатных вакцинных препаратов для профилактики COVID-19 [8]. В дополнение к этим структурным белкам SARS-CoV-2 кодирует 16 неструктурных белков (nsp1–16) и 9 вспомогательных белков.

На сегодняшний день зарегистрировано около 50 вакцинных препаратов для профилактики COVID-19¹. Наиболее широкое распространение получили вакцины, созданные на 4 технологических платформах: векторные вакцины, мРНК-вакцины, инактивированные вакцины и субъединичные вакцины. Наибольшей эффективностью в защите от COVID-19 обладают векторные и мРНК-вакцины [9]. В состав большинства препаратов входит ключевой протективный антиген — поверхностный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2. Иммунизация такими препаратами позволяет сформировать полноценный иммунный ответ к белку [10]: формируется как гуморальный иммунный ответ, препятствующий проникновению вируса в клетку, так

и клеточный цитотоксический иммунный ответ, необходимый для элиминации заражённых клеток [11–15]. При иммунизации инактивированными вакцинами развивается более слабый гуморальный иммунный ответ и почти отсутствует Т-клеточный иммунный ответ. При этом антитела классов IgG, IgM и IgA формируются к различным белкам SARS-CoV-2, а не только к S [16, 17]. Вопрос иммунных коррелятов защиты от COVID-19 ещё изучается, при этом показана прямая корреляция между уровнем вируснейтрализующих антител и защитой от заболевания [18]. При этом большинство эпитопов для нейтрализующих антител находятся в области рецептор-связывающего домена и N-концевого домена гликопротеина S [19].

Вирус SARS-CoV-2 с момента проникновения в популяцию людей активно эволюционирует [20]. На протяжении 4 лет пандемии COVID-19 происходила постоянная смена циркулирующих вариантов возбудителя, что сопровождалось подъёмами заболеваемости. Самый значительный подъём был зарегистрирован в начале 2022 г. и был связан с распространением первых сублиний (BA.1 и BA.2) варианта Omicron вируса SARS-CoV-2². Появление и распространение новых сублиний варианта Omicron (BA.1, BA.5, XBB, BA.2.86 и др.) сопровождалось подъёмами заболеваемости по всему миру, в том числе среди вакцинированного населения, в связи с чем критически важным является проведение постоянного мониторинга эффективности вакцинных препаратов в отношении циркулирующих вариантов для своевременной смены антигенного состава вакцин³.

В русскоязычной литературе нет данных по сравнительному анализу протективной эффективности различных антигенов вируса SARS-CoV-2. Эти данные позволят адекватно оценить необходимость включения в состав вакцинных препаратов для профилактики COVID-19 различных антигенов для наибольшей эффективности в отношении разных вариантов вируса SARS-CoV-2.

¹ COVID-19 Vaccine tracker. Approved vaccines. URL: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/>

² NextStrain. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally since pandemic start. URL: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/all-time>
WHO. WHO COVID-19 dashboard. URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=001>

³ OurWorldInData. United States: COVID-19 weekly death rate by vaccination status, All ages. URL: <https://ourworldindata.org/grapher/united-states-rates-of-covid-19-deaths-by-vaccination-status>

WHO. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. 18.05.2023. URL: <https://www.who.int/news/item/18-05-2023-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines>

WHO. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. 26.04.2024. URL: <https://www.who.int/news/item/26-04-2024-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines>

С учетом высокого уровня изменчивости вируса, целью данного исследования являлось сравнение протективного потенциала структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите животных от COVID-19. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: проанализировать вариабельность структурных белков вируса SARS-CoV-2, провести исследование протективной эффективности различных структурных белков вируса SARS-CoV-2 на модели COVID-19 у лабораторных животных.

Материалы и методы

Вирус

Вирус SARS-CoV-2 был получен из Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: Ухань В.1.1.1 hCoV-19/Russia/Moscow_PMV-1/2020. Все исследования с жизнеспособным вирусом SARS-CoV-2 проводили в помещениях класса BSL-3 согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Нарработку вируса SARS-CoV-2 проводили в культуре клеток Vero E6. Титр инфекционного вируса определяли на культуре клеток Vero E6 по 50% инфекционной дозе для тканевой культуры (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀). Титр TCID₅₀ рассчитывали по методу Спирмена–Кербера.

Линии клеток млекопитающих

Культура клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зелёной марышки) была получена из лаборатории клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Животные

В исследовании использовали трансгенных мышей F1, полученных от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prln/J (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/034860>; статус здоровья SOPF) и нетрансгенных самок C57BL/6 Gamrc (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; статус здоровья SPF), далее — hACE2-трансгенные мыши. В исследовании использовали самок hACE2-трансгенных мышей массой 18–20 г. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 24 от 21.04.2022). Наличие гена hACE2 у мышей линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Prln поколения F1 определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени по протоколу Jackson Laboratory для данной линии мышей [21].

Работа с животными

Содержание и работу с животными осуществляли в соответствии с требованиями по содержанию лабораторных животных⁴. Лабораторных животных ($n = 40$) размещали в клетках для конвенционального содержания на время иммунизации; для проведения экспериментов, связанных с использованием вируса SARS-CoV-2, животных помещали в систему «IsoCage N» («Tecniplast»). Животные имели свободный доступ к воде и корму.

Иммунизация и заражение животных

Для иммунизации животных использовали препараты рекомбинантных вирусных векторов на основе аденовируса человека 5-го серотипа (rAd5), несущие гены структурных белков вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань В.1: rAd5-S (несёт ген гликопротеина S), rAd5-N (несёт ген нуклеопротеина N), rAd5-M (несёт ген мембранного белка M). Животным групп (по 10 особей в группе), получавших вакцину, вводили препараты rAd5 в дозе 10⁹ в.ч./животное внутримышечно двукратно с интервалом 21 сут. Животным контрольной группы ($n = 10$) вводили эквивалентный объём стерильного буферного раствора. Через неделю после 2-й иммунизации животных заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10⁵ TCID₅₀ и в течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали динамику массы тела и выживаемость.

Отбор органов и определение вирусной нагрузки

По 4 животных каждой группы подвергали эвтаназии на 4-й день после заражения с помощью повышенной дозы ингаляционного анестетика с последующей цервикальной дислокацией. Проводили вскрытие животных, отбирали лёгкие для макроскопического анализа и анализа вирусной нагрузки. Отобранные органы промывали физиологическим раствором и готовили 10% гомогенат с использованием прибора «MPbio FastPrep-24». Гомогенаты центрифугировали при 12 000g в течение 10 мин, надосадочную жидкость использовали для дальнейшего анализа. Инфекционный титр вируса определяли на клетках Vero E6 по методике, описанной выше.

Статистические и биоинформатические методы

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью компьютерной программы «GraphPad Prism 10.2.3». При анализе данных использовали t-критерий Стьюдента [22]. При анализе аминокислотных последовательностей структурных белков вируса SARS-CoV-2 была ис-

⁴ Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Карпищенко, С.В. Грачева. М.; 2010. 354 с.

пользована онлайн-база данных covSPECTRUM⁵. На портале cov-spectrum.org в режиме Compare variants проводили попарное сравнение новых вариантов вируса SARS-CoV-2⁶ с исходным вариантом вируса⁷, в разделе Amino acid changes выбирали последовательность нужного белка. Для расчёта вариативности аминокислотного состава количество детектируемых аминокислотных замен делили на общее количество аминокислотных остатков и выражали в процентах.

Результаты

Вариативность структурных антигенов

Нами проведён биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей структурных белков вируса SARS-CoV-2 различных вариантов, которые циркулировали на территории России с марта 2020 г. по июль 2024 г. (таблица). Среди 4 анализируемых белков наибольшее количество аминокислотных замен было обнаружено в гликопротеине S, наименьшее — в нуклеопротеине N. Так, в варианте KS.1, который циркулирует в России с весны 2024 г., в гликопротеине S выявлены 64 аминокислотные замены, а в нуклеопротеине N — 8.

Защитная эффективность структурных белков вируса SARS-CoV-2 на модели летальной инфекции у ACE2-трансгенных мышей

С целью сравнения защитной эффективности структурных белков вируса SARS-CoV-2 нами бы-

Вариативность аминокислотного состава структурных белков вируса SARS-CoV-2, циркулировавшего на территории России в 2020–2024 г.

Variability of amino acid composition of structural proteins of SARS-CoV-2 virus circulating in Russia in 2020–2024

Вариант SARS-CoV-2 variant	Вариативность аминокислотного состава, % относительно исходного варианта вируса Variability of amino acid composition, % relative to the original virus variant			
	S	N	M	E
Delta	0,79	0,59	0,45	0,00
Omicron BA.1	2,83	0,88	1,35	1,33
Omicron BA.5	2,67	1,03	1,35	1,33
Omicron XBB	3,22	1,03	0,90	2,67
Omicron BA.2.86	4,63	1,17	2,25	1,33
Omicron KS.1	5,03	1,17	2,25	1,33

Источник: онлайн-база данных covSPECTRUM.
Source: covSPECTRUM online database.

ли получены рекомбинантные вирусные векторы на основе аденовируса человека 5-го серотипа, несущие гены гликопротеина S, нуклеопротеина N или мембранного белка M. Исследование проводили на hACE2-трансгенных мышах. Животных вакцинировали двукратно с интервалом 21 сут и через 7 дней после 2-го введения препаратов животных заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 (Ухань-подобный) в дозе 10⁵ TCID₅₀ на животное. Анализ эффективности антигенов в защите от инфекции проводили по нескольким параметрам: летальность, тяжесть течения инфекции (снижение веса) и снижение вирусной нагрузки в лёгких вакцинированных животных в сравнении с контролем.

Анализ выживаемости показал, что только использование гликопротеина S в качестве антигена позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (рис. 1, а). Анализ тяжести течения инфекции также продемонстрировал, что только использование гликопротеина S позволяет защитить 100% животных от инфицирования (рис. 1, б).

На 4-е сутки после заражения проводили эвтаназию части животных для макроскопического анализа состояния лёгких и анализа вирусной нагрузки. Анализ состояния лёгких на 4-е сутки после заражения показал, что наиболее выраженные повреждения обнаружены в группе контрольных животных и группе животных, получивших препарат на основе белка M (наблюдаются лейкоцитарная инфильтрация, ателектаз и изменение мембранных структур стенки альвеол). Менее выраженные повреждения выявлены у животных в группе, получившей препарат на основе нуклеопротеина N. У животных, получивших препарат на основе гликопротеина S, повреждения лёгких отсутствовали (рис. 2).

- 5 covSPECTRUM. Detect and analyze variants of SARS-CoV-2. URL: <https://cov-spectrum.org/>
- 6 covSPECTRUM. B.1.617.2 (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=B.1.617.2&>
- 7 covSPECTRUM. BA.1 (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=ba.1&>
- 8 covSPECTRUM. BA.5 (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=ba.5&>
- 9 covSPECTRUM. XBB (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=xbb&>
- 10 covSPECTRUM. BA.2.86 (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=ba.2.86&>
- 11 covSPECTRUM. KS.1 (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=ks.1&>
- 12 covSPECTRUM. B (Nextclade). URL: <https://cov-spectrum.org/explore/World/AllSamples/from%3D2020-01-01%26to%3D2024-10-11/variants?nextcladePangoLineage=B&nextcladePangoLineage1=B.1&>

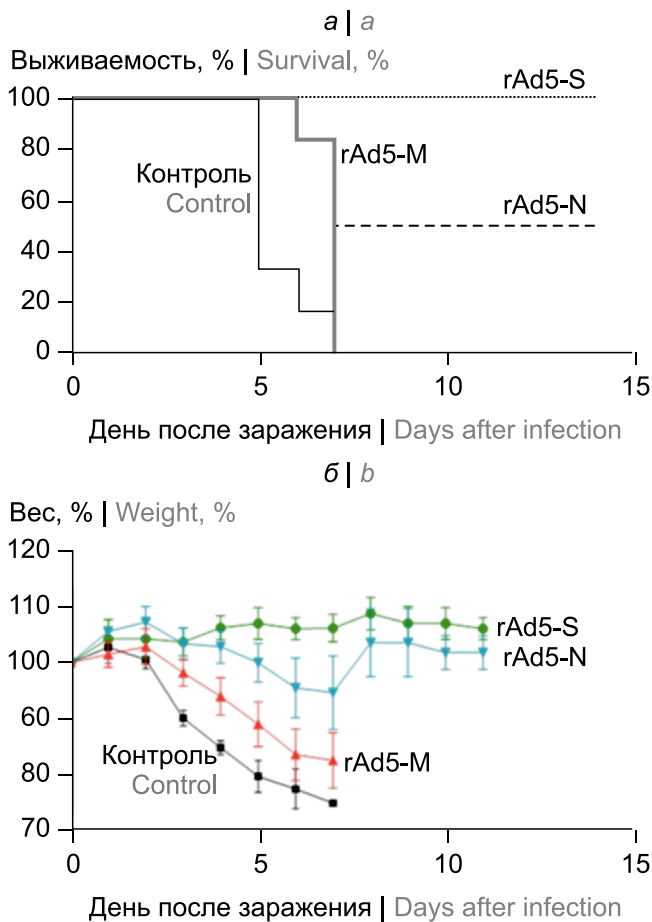


Рис. 1. Выживаемость (а) и динамика массы (б) hACE2-трансгенных мышей, вакцинированных и контрольной групп ($n = 10$ — 0–4-й дни; $n = 6$ — 5–14-й дни) после заражения вирусом SARS-CoV-2.

На фрагменте б отмечено среднее и стандартное отклонение для каждой временной точки.

Fig. 1. Survival (a) and weight dynamics (b) of hACE2-transgenic mice from immunized and control groups ($n = 10$, days 0–4; $n = 6$, days 5–14) after infection with the SARS-CoV-2 virus.

The mean and standard deviation for each time point are shown in the figure (b).

При анализе вирусной нагрузки в лёгких заражённых животных в контрольной группе и в группах, получивших препараты на основе нуклеопротеина N и мембранного белка M, обнаружен жизнеспособный вирус. У животных, получивших препарат на основе нуклеопротеина N, выявлено достоверное снижение вирусной нагрузки на $1,3 \lg \text{TCID}_{50}$. В группе, получившей препарат на основе гликопротеина S, жизнеспособный вирус SARS-CoV-2 отсутствовал, а снижение вирусной нагрузки составило $5 \lg \text{TCID}_{50}$ (рис. 3).

Обсуждение

При выборе антигена для включения в состав кандидатных вакцинных препаратов важно иметь понимание об иммунологических особенностях ответа на натуральную инфекцию COVID-19.

Взаимодействие иммунных клеток с основными структурными белками вируса индуцирует формирование противовирусного иммунного ответа. Для вируса SARS-CoV-2 такими структурными белками являются S, M, N и E. Несмотря на иммуногенность гликопротеина S, нуклеопротеин N и мембранный белок M также вносят существенный вклад в развитие специфического иммунного ответа. У пациентов с COVID-19 на ранних сроках детектируют появление специфических антител к N-белку, в то время как антитела к гликопротеину S детектируют на 4–8-е сутки после появления симптомов заболевания, что, по всей видимости, связано с наибольшей представленностью нуклеопротеина N в вирионе [23, 24]. Клеточный иммунный ответ также играет важную роль в защите против COVID-19. В ряде исследований было показано, что активная пролиферация CD4^+ - и CD8^+ -Т-клеток коррелирует с менее тяжёлым течением болезни и высокой степенью элиминации вируса⁸. Клеточный иммунный ответ также в значительной степени специфичен к структурным белкам SARS-CoV-2. В результате определения репертуара Т-клеточных эпитопов SARS-CoV-2, включающего 21 исследование, показано, что из общего числа проанализированных CD4^+ -эпитопов к белку S относятся 33%, к белку N — 11%, к белку M — 10%; из общего числа проанализированных CD8^+ -эпитопов к белку S относятся 26%, к белку N — 7%, к белку M — 6% [25]. Полифункциональный N-специфичный CD8^+ -Т-клеточный ответ ассоциирован с более лёгкой тяжестью заболевания COVID-19 [26]. Поскольку N консервативен между различными вариантами SARS-CoV-2, N-специфичные CD4^+ -Т-клетки потенциально могут обеспечивать защиту против различных генетических вариантов SARS-CoV-2 [27].

Сегодня большинство вакцин для профилактики COVID-19, применяемых в клинической практике, основаны на использовании гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. Однако до сих пор ведутся дебаты, какой антиген следует включать в состав препаратов для профилактики COVID-19. Это связано с высокой вариабельностью гликопротеина S и со снижением эффективности существующих вакцин на его основе в отношении новых вариантов вируса SARS-CoV-2.

При анализе аминокислотных последовательностей структурных белков вируса SARS-CoV-2 — вариантов от Delta до актуального KS.1 — нами было продемонстрировано, что наибольшее число замен выявлено в гликопротеине S, наименьшее — в нуклеопротеине N, что делает N белок наиболее консервативным среди структурных белков вируса SARS-CoV-2.

⁸ CDC. CDC Museum COVID-19 timeline. Centers for Disease Control and Preventio.

URL: <https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>

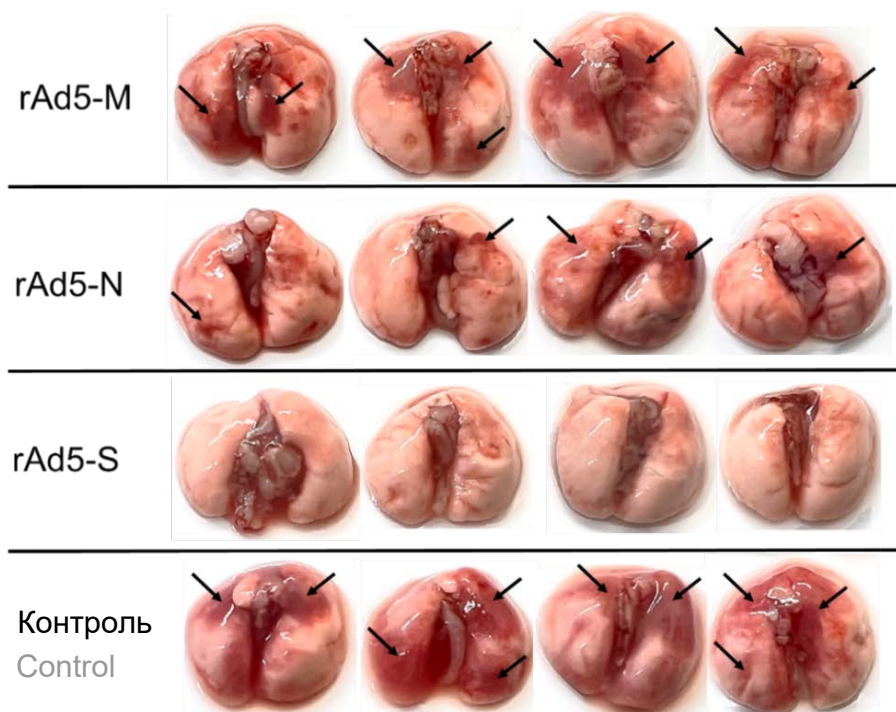


Рис. 2. Фотографии лёгких hACE2-трансгенных мышей — вакцинированных и контрольной группы ($n = 4$), на 4-е сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2. Стрелками отмечены зоны поражения лёгочной ткани.

Fig. 2. Photographs of the lungs of hACE2-transgenic mice from the immunized and control groups ($n = 4$) on day 4 after infection with the SARS-CoV-2 virus. Arrows indicate areas of lung tissue damage.

С целью прямого сравнения протективного потенциала структурных белков вируса SARS-CoV-2, наиболее представленных в вирионе, нами были получены кандидатные препараты на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го серотипа, несущих структурные белки вируса SARS-CoV-2: rAd5-M, rAd5-N и rAd5-S. Данными препаратами иммунизировали hACE2-трансгенных мышей, после чего животных заражали вирусом SARS-CoV-2 В.1.1.1 для оценки протективной эффективности. Мембранный белок М не проявил защитной эффективности — все вакцинированные животные погибли после заражения, а в лёгких на 4-е сутки после заражения обнаружили жизнеспособный вирус в титре, схожем с контрольными невакцинированными животными. Аналогичные данные были получены J. Chen и соавт. при исследовании эффективности использования препаратов на основе плазмидных ДНК [28]. Использование в качестве антигена нуклеопротеина N позволяет снизить вирусную нагрузку в лёгких иммунизированных животных, однако снижение не достигает требуемых 2 lg, в то же время в лёгких вакцинированных животных выявили патологические повреждения, а защита от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, составила лишь 50%, что соотносится с исследованиями других авторов [29–32]. Использование в качестве антигена гликопротеина S позволило сформировать протективный иммунитет

у животных (в лёгких отсутствуют патологические повреждения и жизнеспособный вирус) и защитить всех животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, что подтверждается иссле-

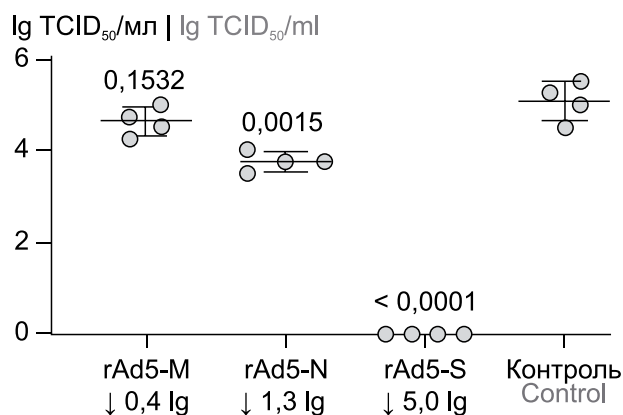


Рис. 3. Вирусная нагрузка в лёгких hACE2-трансгенных мышей — вакцинированных и контрольной групп ($n = 4$), на 4-е сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2.

Отмечены индивидуальные данные по каждому животному, среднее арифметическое и стандартное отклонение, уровень значимости p (t-критерий Стьюдента).

Fig. 3. Viral load in the lungs of hACE2-transgenic mice from the immunized and control groups ($n = 4$) on day 4 after infection with the SARS-CoV-2 virus.

The figure shows individual data for each animal, the arithmetic mean and standard deviation, as well as the significance level p (Student's t-test).

дованиями других авторов [33–36]. J. Chen и соавт. продемонстрировали, что совместная иммунизация двумя вакцинами на основе ДНК, несущими гены белков S и N, индуцирует более выраженный клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также обладает большей протективной эффективностью в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели инфекции у мышей [32]. R.L. Hajnik и соавт. на модели COVID-19 у хомяков показали, что вакцинация комбинированным препаратом мРНК-S+N индуцирует более выраженный протективный ответ в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Delta и Omicron по сравнению с монокомпонентными препаратами [37]. Исходя из вышесказанного, следует рассмотреть возможность комбинации антигенов в составе вакцинных препаратов для профилактики COVID-19 в будущих исследованиях. Однако стоит учитывать, что включение в состав вакцинных препаратов нескольких антигенов значительно повышает стоимость производственного процесса и, как следствие, стоимость препарата.

Анализ данных эффективности разных вакцин для профилактики COVID-19 в рамках контролируемых клинических исследований по всему миру показал, что мРНК- и векторные вакцины, несущие ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, позволяют сформировать наиболее высокий уровень защиты населения по показателям заболеваемости, госпитализации и COVID-19-ассоциированных смертей [9, 38]. Учитывая постоянную смену циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2, снижение эффективности используемых вакцин в отношении новых вариантов вируса [39] и сохраняющийся высокий уровень заболеваемости COVID-19, необходимо проводить непрерывный мониторинг эффективности вакцинных препаратов в отношении новых вариантов вируса. В случае выявления снижения эффективности необходимо проводить актуализацию антигенного состава вакцин. Данные исследования гармонизируются с исследованиями ВОЗ, по результатам которых с 2022 г. ВОЗ выпускает рекомендации о смене антигенного состава вакцин⁹. В 2023 г. по результатам мониторинга эффективности была проведена актуализация антигенного состава российских вакцин линейки «Гам-КОВИД-Вак» (векторные вакцины, несущие ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2) под сублинию ХВВ, проведённые клинические исследования вакцин с обновлённым составом показали благоприятный профиль безопасности, формирование нейтрализующих антител к циркулировавшим в 2023 г. и циркулирующим в 1-й половине 2024 г. сублиниям варианта Omicron, и сегодня препараты внедрены в гражданский обо-

рот для защиты населения от актуальных циркулирующих вариантов SARS-CoV-2.

Выводы

Вирус SARS-CoV-2 активно эволюционирует, что приводит к появлению новых вариантов вируса. Среди структурных белков наибольшей изменчивости подвержен поверхностный гликопротеин S, который играет важную роль в жизненном цикле вируса — интернализации, а также является ключевой мишенью для нейтрализующих антител.

Сравнительный анализ протективного потенциала разных структурных белков вируса SARS-CoV-2 на модели летальной инфекции у животных показал, что только использование гликопротеина S позволяет сформировать протективный иммунный ответ, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, при этом снижение вирусной нагрузки в лёгких животных на 4-е сутки после заражения составило 5,0 lg TCID₅₀ (100 000 раз). В то же время использование нуклеопротеина N привело к снижению вирусной нагрузки на 1,3 lg TCID₅₀ (20 раз), а защита от летальной инфекции составила 50%.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Ke Z., Oton J., Qu K., et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*. 2020;588(7838):498–502. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
2. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 2020;5(4):562–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
3. Du S., Cao Y., Zhu Q., et al. Structurally resolved SARS-CoV-2 antibody shows high efficacy in severely infected hamsters and provides a potent cocktail pairing strategy. *Cell*. 2020;183(4):1013–23.e13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.035>
4. Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;584(7821):443–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>
5. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020;584(7821):437–42. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
6. Mu J., Xu J., Zhang L., et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci. China Life Sci.* 2020;63(9):1413–6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1692-1>
7. Zhang Z., Nomura N., Muramoto Y., et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat. Commun.* 2022;13(1):4399. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>
8. Dai L., Gao G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021;21(2):73–82. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
9. Graña C., Ghosn L., Evrenoglou T., et al. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2022;12(12):CD015477. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015477>

⁹ WHO. Technical Advisory Group on COVID-19 Vaccine Composition. URL: [https://www.who.int/groups/technical-advisory-group-on-covid-19-vaccine-composition-\(tag-co-vac\)](https://www.who.int/groups/technical-advisory-group-on-covid-19-vaccine-composition-(tag-co-vac))

10. Rijkers G.T., Weterings N., Obregon-Henao A., et al. Antigen presentation of mRNA-based and virus-vectored SARS-CoV-2 vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(8):848. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9080848>
11. Sahin U., Muik A., Derhovanessian E., et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020;586(7830):594–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
12. Mulligan M.J., Lyke K.E., Kitchin N., et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. 2020;586(7830):589–93. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>
13. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
14. Tikhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine against SARS-CoV-2 in healthy adolescents: an open-label, non-randomized, multicenter, phase 1/2, dose-escalation study. *Front. Immunol.* 2023;14:1228461. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228461>
15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
16. Al-Shudifat A.E., Al-Tamimi M., Dawoud R., et al. Anti-S and Anti-N antibody responses of COVID-19 vaccine recipients. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(9):1398. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11091398>
17. Qaqish A., Abbas M.M., Al-Tamimi M., et al. SARS-CoV-2 antinucleocapsid antibody response of mRNA and inactivated virus vaccines compared to unvaccinated individuals. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(5):643. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10050643>
18. Goldblatt D., Alter G., Crotty S., Plotkin S.A. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol. Rev.* 2022;310(1):6–26. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.13091>
19. Finkelstein M.T., Mermelstein A.G., Parker Miller E., et al. Structural analysis of neutralizing epitopes of the SARS-CoV-2 spike to guide therapy and vaccine design strategies. *Viruses*. 2021;13(1):134. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13010134>
20. Markov P.V., Ghafari M., Beer M., et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023;21(6):361–79. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>
21. McCray PB Jr., Pewe L., Wohlford-Lenane C., et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2007;81(2):813–21. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06>
22. Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. *Экология человека*. 2011; (5): 55–60. Unguryanu T.N., Grjibovski A.M. Brief recommendations on description, analysis and presentation of data in scientific papers. *Human Ecology*. 2011; (5): 55–60.
23. Tan Y.J., Goh P.Y., Fielding B.C., et al. Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004;11(2):362–71. DOI: <https://doi.org/10.1128/cdli.11.2.362-371.2004>
24. Wu H.S., Hsieh Y.C., Su I.J., et al. Early detection of antibodies against various structural proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *J. Biomed. Sci.* 2004;11(1):117–26. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02256554>
25. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020;26(4):450–2. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
26. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020;21(11):1336–45. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
27. Yang G., Wang J., Sun P., et al. SARS-CoV-2 epitope-specific T cells: Immunity response feature, TCR repertoire characteristics and cross-reactivity. *Front. Immunol.* 2023;14:1146196. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1146196>
28. Chen J., Deng Y., Huang B., et al. DNA vaccines expressing the envelope and membrane proteins provide partial protection against SARS-CoV-2 in mice. *Front. Immunol.* 2022;13:827605. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827605>
29. Matchett W.E., Joag V., Stolley J.M., et al. Cutting Edge: nucleocapsid vaccine elicits spike-independent SARS-CoV-2 protective immunity. *J. Immunol.* 2021;207(2):376–9. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100421>
30. Rabdano S.O., Ruzanova E.A., Pletyukhina I.V., et al. Immunogenicity and in vivo protective effects of recombinant nucleocapsid-based SARS-CoV-2 vaccine Convacell®. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(4):874. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11040874>
31. Primard C., Monchâtre-Leroy E., Del Campo J., et al. OVX033, a nucleocapsid-based vaccine candidate, provides broad-spectrum protection against SARS-CoV-2 variants in a hamster challenge model. *Front. Immunol.* 2023;14:1188605. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188605>
32. Chen J., Huang B., Deng Y., et al. synergistic immunity and protection in mice by co-immunization with DNA vaccines encoding the spike protein and other structural proteins of SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):243. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020243>
33. Wu Y., Huang X., Yuan L., et al. A recombinant spike protein subunit vaccine confers protective immunity against SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters. *Sci. Transl. Med.* 2021;13(606):eabg1143. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg1143>
34. Brocato R.L., Kwilas S.A., Kim R.K., et al. Protective efficacy of a SARS-CoV-2 DNA vaccine in wild-type and immunosuppressed Syrian hamsters. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1):16. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00279-z>
35. DiPiazza A.T., Leist S.R., Abiona O.M., et al. COVID-19 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge. *Immunity*. 2021;54(8):1869–82.e6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.018>
36. Darling T.L., Ying B., Whitener B., et al. mRNA-1273 and Ad26.COV2.S vaccines protect against the B.1.621 variant of SARS-CoV-2. *Med.* 2022;3(5):309–24.e6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.03.009>
37. Hajnik R.L., Plante J.A., Liang Y., et al. Dual spike and nucleocapsid mRNA vaccination confer protection against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in preclinical models. *Sci. Transl. Med.* 2022;14(662):eabq1945. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq1945>
38. Kyriakidis N.C., López-Cortés A., González E.V., et al. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1):28. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
39. Wu N., Joyal-Desmarais K., Ribeiro P.A.B., et al. Long-term effectiveness of COVID-19 vaccines against infections, hospitalisations, and mortality in adults: findings from a rapid living systematic evidence synthesis and meta-analysis up to December, 2022. *Lancet Respir. Med.* 2023;11(5):439–52. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00015-2)

Информация об авторах

Должикова Инна Вадимовна[✉] — к. б. н., зав. лаб. Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dolzhikova@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

Гроусова Дарья Михайловна — м. н. с. лаб. Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

Зорков Илья Дмитриевич — м. н. с. лаб. Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8311-2283>

Илюхина Анна Алексеевна — м. н. с. лаб. Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0728-5478>

Ковыршина Анна Витальевна — н. с. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8757-7026>

Зубкова Ольга Вадимовна — к. б. н., в. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

Попова Ольга Дмитриевна — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

Ожаровская Татьяна Андреевна — к. б. н., с. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

Зрелкин Денис Игоревич — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

Савина Дарья Михайловна — н. с. подразделения по внедрению в производства научных разработок НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2228-3406>

Самохвалова Екатерина Геннадьевна — н. с. лаб. Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0127-173X>

Тухватулин Амир Ильдарович — к. б. н., зав. лаб. микоплазм и Л-форм бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8506-2339>

Щебляков Дмитрий Викторович — к. б. н., зав. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Логунов Денис Юрьевич — д. б. н., академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гинцбург Александр Леонидович — д. б. н., проф., академик РАН, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; зав. кафедрой инфектологии и вирусологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Участие авторов: *Должикова И.В.* — анализ результатов исследования, статистическая обработка, написание текста; *Гроусова Д.М., Зорков И.Д., Илюхина А.А., Ковыршина А.В.* — исследование протективной эффективности препаратов на модели инфекции у животных; *Зубкова О.В., Попова О.Д., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И.* — получение и наработка рекомбинантных аденовирусных векторов; *Савина Д.М., Самохвалова Е.Г.* — поддержание линии трансгенных мышей; *Тухватулин А.И., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.* — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 17.08.2024;
принята к публикации 30.10.2024;
опубликована 30.12.2024

Information about the authors

Inna V. Dolzhikova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, State virus collection laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, dolzhikova@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

Daria M. Grousova — junior researcher, State virus collection laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

Ilya D. Zorkov — junior researcher, State virus collection laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8311-2283>

Anna A. Ilyukhina — junior researcher, State virus collection laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0728-5478>

Anna V. Kovyreshina — researcher, Cellular microbiology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8757-7026>

Olga V. Zubkova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Immunobiotechnology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

Olga D. Popova — junior researcher, Immunobiotechnology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

Tatiana A. Ozharovskaya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Immunobiotechnology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

Denis I. Zrelkin — junior researcher, Immunobiotechnology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

Daria M. Savina — researcher, Division for implementation of scientific developments into production, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2228-3406>

Ekaterina G. Samokhvalova — researcher, State virus collection laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0127-173X>

Amir I. Tukhvatulin — Cand. Sci. (Biol.), Head, Mycoplasmas and L-forms of bacteria laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8506-2339>

Dmitry V. Shchablyakov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Immunobiotechnology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Denis Yu. Logunov — D. Sci. (Biol.), Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Cellular microbiology laboratory, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Alexander L. Gintsburg — D. Sci. (Biol.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Head, Department of infectology and virology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Author contribution: *Dolzhikova I.V.* — analysis of study results, statistical processing, writing the text; *Grousova D.M., Zorkov I.D., Ilyukhina A.A., Kovyreshina A.V.* — study of the protective efficacy of drugs on an animal infection model; *Zubkova O.V., Popova O.D., Ozharovskaya T.A., Zrelkin D.I.* — obtaining and producing recombinant adenoviral vectors; *Savina D.M., Samokhvalova E.G.* — maintaining the transgenic mice line; *Tukhvatulin A.I., Shchablyakov D.V., Logunov D.Yu., Ginzburg A.L.* — study concept and design, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 17.08.2024;
accepted for publication 30.10.2024;
published 30.12.2024



Клиническое исследование иммуногенности и защитной активности живой рекомбинантной вакцины «ГамЖВК» интраназального применения для профилактики коклюша у взрослых добровольцев

Лиджиева А.А.¹, Медкова А.Ю.^{1,2}, Куликов С.В.¹, Синяшина Л.Н.¹, Сюндюкова Р.А.¹, Марков А.П.¹, Верведа А.Б.^{2,3}, Абаева Н.Е.⁴, Чернышова И.Н.⁴, Гаврилова М.В.^{1,4}, Бушкова К.К.⁴, Дьяков И.Н.^{1,4}, Каратаев Г.И.¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт промышленной и морской медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³Научно-исследовательский центр Эко-безопасность, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Рост заболеваемости коклюшем в мире, недостаточная продолжительность, эффективность и способность иммунитета, индуцированного бесклеточной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной, обеспечить противобактерийную защиту и предотвратить передачу возбудителя от человека к человеку обосновывают необходимость разработки новых противокклюшных вакцин. Живая коклюшная вакцина «ГамЖВК» интраназального применения прошла доклинические исследования в экспериментах с низшими приматами и две стадии клинических исследований на взрослых добровольцах, доказавшие её безопасность, иммуногенность и защитную активность. Отработаны метод и схема введения препарата.

Цель работы — подтверждение иммуногенности и защитной противобактерийной активности «ГамЖВК» в рандомизированном многоцентровом клиническом исследовании на взрослых добровольцах.

Материалы и методы. В многоцентровом клиническом рандомизированном плацебо-контролируемом двойном слепом исследовании приняли участие 260 здоровых добровольцев в возрасте 18–65 лет. Из них 210 человек были рандомизированы в группу вакцинированных «ГамЖВК» и 50 человек — в группу плацебо. Препарат «ГамЖВК» вводили дважды в каждый носовой ход по 0,25 мл (5×10^9 КОЕ) с интервалом 60 дней. Методом иммуноферментного анализа и реакции агглютинации определяли уровни специфических к *Bordetella pertussis* IgG-, IgA-антител в сыворотке крови и IgA в назальных аспиратах. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени измеряли число геном-эквивалентов *B. pertussis* в ротоглоточных смывах для оценки динамики элиминации аттенуированных бактерий *B. pertussis* после первого и повторного введения «ГамЖВК» добровольцам.

Результаты. Показаны достоверные сероконверсия по специфическим IgG и IgA в крови и рост уровня секреторных IgA в назальных аспиратах добровольцев. Динамика изменения содержания IgG и IgA указывает на бустерный эффект после повторной вакцинации. Аттенуированные бактерии *B. pertussis* персистируют в носо- и ротоглотке вакцинированных. Время выведения бактерий после 2-й вакцинации сокращается более чем в 2 раза в сравнении с 1-м введением, при этом количество персистирующих бактерий после 2-й вакцинации составляет менее 3% от значений после 1-й вакцинации.

Заключение. Доказаны высокая иммуногенность и формирование противобактерийной защиты после однократной и двукратной интраназальной вакцинации добровольцев «ГамЖВК».

Ключевые слова: вакцина «ГамЖВК», *Bordetella pertussis*, многоцентровое клиническое исследование, добровольцы, иммуногенность, защитная эффективность, коклюш, гуморальный иммунный ответ

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Советом по этике при Министерстве здравоохранения РФ (выписка № 277 от 08.06.2021), Этическим комитетом Инфекционной больницы № 1 (Москва, протокол заседания № 5 от 08.12.2021), Комитетом по вопросам этики при ООО «НИЦ Эко-безопасность» (выписка № 5 из протокола заседания № 221 от 20.01.2022, выписка № 2 из протокола заседания № 222 от 27.01.2022).

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: Лиджиева А.А., Медкова А.Ю., Куликов С.В., Синяшина Л.Н., Сюндюкова Р.А., Марков А.П., Верведа А.Б., Абаева Н.Е., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К., Дьяков И.Н., Каратаев Г.И. Клиническое исследование иммуногенности и защитной активности живой рекомбинантной вакцины «ГамЖВК»

интраназального применения для профилактики коклюша у взрослых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(6):779–793.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-585>
EDN: <https://www.elibrary.ru/vzqpli>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-585>

A clinical study of the immunogenicity and protective potency of a live recombinant GamLPV vaccine for intranasal use for the prevention of whooping cough in adult volunteers

Alevtina A. Lidzhieva¹, Alisa Yu. Medkova¹✉, Sergey V. Kulikov¹, Ludmila N. Sinyashina¹, Rezida A. Sioundiukova¹, Andrey P. Markov¹, Aleksey B. Verveda^{2,3}, Natalya E. Abaeva⁴, Irina N. Chernyshova⁴, Marina V. Gavrilova^{1,4}, Kristina K. Bushkova⁴, Ilya N. Dyakov^{1,4}, Gennady I. Karataev¹

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²Research Institute of Industrial and Maritime Medicine, St. Petersburg, Russia;

³Eco-Safety Research Center LLC, St. Petersburg, Russia;

⁴I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The increase in incidence rate of pertussis worldwide, short-term insufficient immunity induced by acellular pertussis vaccines (TDaP) and their failure to provide antibacterial protection and to prevent transmission of infection in human population dictate the development of new pertussis vaccines. A new live recombinant pertussis vaccine for intranasal use (GamLPV) has completed preclinical studies in experiments on nonhuman primates and 2 phases of clinical trials involving adult healthy volunteers, in which the safety, immunogenicity and protective activity of the GamLPV were proven. Method and scheme of vaccine administration have been worked out.

Aim. Confirmation of the immunogenicity and protective antibacterial potency of GamLPV in a randomized multicenter clinical trial on adult volunteers.

Materials and methods. In this multicenter, clinical, randomized, placebo-controlled, double-blind study 260 healthy adults aged 18–65 years were divided into 2 groups: G1 — 210 volunteers (GamLPV) and G2 — 50 volunteers (placebo). 0.25 ml GamLPV delivered to each nostril (5×10^9 CFU) 60 days apart. Levels of *Bordetella pertussis*-specific IgG, IgA antibodies in blood serum and levels of *B. pertussis*-specific secretory IgA antibodies in nasopharyngeal aspirates were measured by ELISA method and agglutination test. The dynamics of elimination of attenuated *B. pertussis* bacteria after the first and second intranasal administration of GamLPV to volunteers was estimated by using qPCR.

Results. Significant seroconversion of *B. pertussis*-specific IgG and IgA antibodies and growth of *B. pertussis*-specific secretory IgA antibody levels in nasal aspirates of volunteers were demonstrated. The dynamics of changes in the levels of IgG and IgA antibodies indicates a booster effect after second vaccination. Attenuated *B. pertussis* bacteria persist in the nose/oropharynx of vaccinated volunteers. The period of elimination after second vaccination is more than 2 times shorter than the period after the first one. The number of persistent *B. pertussis* bacteria after the second vaccination is less than 3% of the values after the first vaccination.

Conclusion. High immunogenicity and the formation of antibacterial protection after single and double intranasal vaccination of GamLPV have been proven.

Keywords: vaccine GamLPV, multicenter clinical trial, volunteers, immunogenicity, protective potency

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Council of the Ministry of Health of the Russian Federation (extract No. 277 of 08.06.2021), the Ethics Committee of Infectious Diseases Hospital No. 1 (Moscow, meeting protocol No. 5 of 08.12.2021), the Ethics Committee of Eco-safety research center LLC LLC (extract No. 5 of meeting protocol No. 221 of 20.01.2022, extract No. 2 of meeting protocol No. 222 of 27.01.2022).

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: Lidzhieva A.A., Medkova A.Yu., Kulikov S.V., Sinyashina L.N., Sioundiukova R.A., Markov A.P., Verveda A.B., Abaeva N.E., Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Dyakov I.N., Karataev G.I. A clinical study of the immunogenicity and protective potency of a live recombinant GamLPV vaccine for intranasal use for the prevention of whooping cough in adult volunteers. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):779–793. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-585>
EDN: <https://www.elibrary.ru/vzqpli>

Введение

Коклюш — высококонтагиозное инфекционное заболевание, передающееся воздушно-капельным путём, контролируемое с помощью вакцинопрофилактики. Вакцинация против коклюша входит в календари обязательных прививок большинства стран мира, начиная с раннего детского возраста. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время 42 страны используют для профилактики коклюша бесклеточные коклюшно-дифтерийно-столбнячные вакцины (АаКДС), содержащие бесклеточный коклюшный компонент (БКВ), а 143 — коклюшно-дифтерийно-столбнячную адсорбированную вакцину, содержащую корпускулярный коклюшный компонент. Однако начиная с 2000-х гг. массовое использование БКВ в экономически развитых странах привело к росту заболеваемости коклюшем в этих странах, приближающемуся в отдельные годы к уровню довакцинационного периода [1]. Изменилась возрастная структура в сторону увеличения процента заболеваемости среди подростков и взрослых [2]. Рост заболеваемости коклюшем среди старших детей и взрослого населения привёл к пониманию необходимости их ревакцинации. Изучается целесообразность вакцинации беременных [3], матерей и близких родственников для формирования «семейного иммунитета», предотвращающего инфицирование младенцев [4]. В качестве одной из причин роста заболеваемости рассматривают низкую эффективность и непродолжительность иммунитета после вакцинации БКВ, а также их неспособность формировать противобактериальный иммунитет [5]. Реактогенность корпускулярного коклюшного компонента и низкая эффективность БКВ стимулируют разработку новых препаратов, способных индуцировать длительный противобактериальный иммунитет, не травмирующий организм при вакцинации и удобных для массового применения.

В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана живая рекомбинантная вакцина интраназального применения для профилактики коклюша, названная «ГамЖВК». Вакцина «ГамЖВК» к настоящему времени прошла доклинические исследования и II фазу клинических исследований на взрослых здоровых добровольцах, доказавшие её безопасность, иммуногенность и защитную активность, отработаны способ и схема введения препарата [6–10]. Аналогичная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (BPZE1), разработанная во Франции, находится на стадии клинических исследований [11–13].

Целью настоящей работы является подтверждение иммуногенности и защитной активности вакцины «ГамЖВК» при двукратном применении у взрослых добровольцев в возрасте 18–65 лет в многоцентровом клиническом исследовании.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено рандомизированное плацебо-контролируемое слепое многоцентровое клиническое исследование, посвящённое изучению иммуногенности и безопасности живой вакцины «ГамЖВК» по Протоколу клинического исследования № 03-ГамЖВК-2021, версия 3 от 28.01.2021, разрешение Министерства здравоохранения России № 277 от 08.06.2021.

Протокол клинического исследования № 03-ГамЖВК-2021 был одобрен Советом по этике при Министерстве здравоохранения РФ (выписка № 277 от 08.06.2021), а также локальными этическими комитетами:

- Этическим комитетом ИКБ № 1 ДЗМ (протокол заседания № 5 от 08.12.2021);
- Комитетом по вопросам этики при ООО «НИЦ Эко-безопасность» (выписка № 5 из протокола заседания № 221 от 20.01.2022; выписка № 2 из протокола заседания № 222 от 27.01.2022).

Ниже приведены критерии включения и невключения, значимые для оценки иммуногенности используемой вакцины и бактериальной нагрузки в носоглоточных аспиратах. Полный перечень критериев включения, невключения, досрочного исключения добровольца из исследования, состав и способ введения препарата, критериев оценки иммуногенности и эффективности препарата в соответствии с Протоколом представлены в **Приложении** к статье на сайте журнала.

При составлении протокола в исследования в качестве одного из критериев включения использовали уровень IgG-антител к *Bordetella pertussis* на момент включения. При этом диапазон значений уровня IgG-антител определяли на основании данных, полученных с использованием тест-системы «Ridascreen». Согласно указанной системе серонегативными (СН) считались добровольцы с уровнем IgG-антител менее 14 ЕД/мл, уровень антител считался неопределённым («серая зона», СЗ) в диапазоне от 14 до менее 18 ЕД/мл, и серопозитивными (СП) считались добровольцы с уровнем IgG-антител 18 ЕД/мл и более. Согласно протоколу в исследование могли включать добровольцев как СН, так и слабо- и умеренно-СП — с уровнем IgG-антител не выше 45 ЕД/мл. К моменту включения добровольцев в исследование тест-система «Ridascreen» была заменена на тест-систему «ESR120G» («Virion/Serion GmbH») в связи с организационными трудностями, связанными с отсутствием тест-системы «Ridascreen» на территории России. Согласно инструкции к набору «ESR120G» («Virion/Serion GmbH») СН считаются образцы с уровнем антител менее 40 МЕ/мл, СЗ — 40–50 МЕ/мл, СП — более

50 МЕ/мл. Уровень IgG-антител, равный 45 ЕД/мл при определении с помощью набора «Ridascreen», при пересчёте эквивалентен уровню IgG-антител, равному 126 МЕ/мл при определении с использованием набора «ESR120G» («Virion/Serion GmbH»).

Критерии включения: мужчины и женщины в возрасте 18–65 лет; стабильное с медицинской точки зрения состояние, отсутствие специфических антител IgM к возбудителю коклюша, уровень специфических к возбудителю коклюша IgG < 126 МЕ/мл («SERION ELISA classic ESR120G»), отсутствие ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных аспиратах, подтверждённое методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Критерии не включения: наличие коклюша в анамнезе; перенесённая вакцинация против коклюша в течение последних 10 лет, а также любая вакцинация в течение последнего года; любое заболевание, которое, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования или может привести к ухудшению состояния здоровья в ходе исследования; зарегистрированные сильные поствакцинальные осложнения в анамнезе; курсовой приём лекарственных препаратов с профилактической или лечебной целью в течение 1 мес до скрининга; участие в других клинических исследованиях, наличие специфических IgM к возбудителю коклюша, уровень специфических IgG > 126 МЕ/мл («SERION ELISA classic ESR120G»), наличие ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных/ротоглоточных аспиратах.

Обследование добровольцев и рандомизация

Все добровольцы, участвовавшие в исследовании, подписали форму добровольного информированного согласия, после чего им присвоен номер и проведены скрининговые исследования. Соответствие всем критериям включения/невключения было подтверждено до включения добровольцев в исследование. Популяцию исследования составили 260 добровольцев мужского и женского пола в возрасте 18–65 лет (включительно), отобранных в соответствии с критериями включения и не имеющих критериев не включения. Добровольцы распределены на 2 группы: получивших препарат «ГамЖВК» (группа «вакцинированные»; $n = 210$) и получивших плацебо (группа «плацебо»; $n = 50$) в соответствии с процедурой рандомизации протокола. Группа вакцинированных была разбита на 3 подгруппы по содержанию специфических противокклюшных IgG-антител до 1-го введения вакцины: 1-я подгруппа — СН ($n = 168$); 2-я — СЗ ($n = 7$); 3-я — СП ($n = 35$).

Клиническое исследование включало 1-е введение препарата, период наблюдения 60 ± 5 дней, 2-е введение препарата и период наблюдения 60 ± 5 дней. Определение уровня специфических антител IgG и IgA (иммуноферментный анализ (ИФА),

в сыворотке крови, рото- и назофарингеальных секретах) и титров агглютинации сывороткой крови добровольцев суспензии бактерий возбудителя коклюша (реакция агглютинации, РА) при каждом введении препарата проводили перед введением (день 1-й), после введения на 8, 15, 29 и 60-й дни. Определение бактериальной нагрузки в рото- и назофарингеальных секретах методом ПЦР при каждом введении препарата проводили перед введением, после 1-го введения через 1 ч (1-й день), на 4, 8, 15, 29 и 60-й дни. Рандомизация и процедуры визитов представлены в Приложении к статье на сайте журнала.

Исследуемый препарат, дозы и способ введения

«ГамЖВК», живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша на основе аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS [14], в виде лиофилизата для приготовления суспензии интраназального введения произведена филиалом «Медгамал» НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Серии вакцины, использованные в клиническом исследовании, прошли все необходимые этапы контроля.

Препарат вводили в дозе 5×10^9 КОЕ в форме суспензии интраназально, закапывая по 0,25 мл в каждый носовой ход через шприц без иглы, двукратно, с интервалом 2 мес (60 ± 5 дней). В качестве плацебо применяли стерильный раствор лиофилизата стабилизатора. Оба препарата восстанавливали в 1 мл 0,9% NaCl для инъекций.

Количественное определение ДНК *B. pertussis*

Для ПЦР в реальном времени (РВ) использовали ДНК, выделенную из смывов заднеглоточных и назофарингеальных зондов (далее — аспиратов), помещённых в одну пробирку. Образцы после центрифугирования обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на сорбенте [15]. Для определения количества геном-эквивалента (ГЭ) ДНК *B. pertussis* использовали разработанную и валидированную нами тест-систему ПЦР-РВ [16]. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе «CFX-96 Touch» («Bio-Rad»).

Время элиминации аттенуированных бактерий из носо- и ротоглотки оценивали как временной промежуток в днях от момента введения (1 ч) до достижения установленного уровня. В качестве уровня, по достижении которого определяли момент завершения элиминации бактерий, были приняты средние значения уровня ДНК *B. pertussis* в обеих группах на этапе скрининга — 0,7 ГЭ/мл. Если указанный уровень не достигался, то время элиминации принималось равным 100 дням. Для сравнения групп добровольцев после 2-го введения бактерий и 1-й вакцинацией использовали метод Каплана–Мейера (модуль «Анализ выживаемости» — «Сравнение двух выборок» программы «Statistica

в. 10.0»), позволяющий использовать цензурированные данные. К цензурированным данным были отнесены случаи, когда не достигался установленный уровень 0,7 ГЭ/мл. Такие случаи были отмечены после 1-й вакцинации, составив 6,2% (13 из 210), и 1 случай — менее 1,0% после 2-й вакцинации (1 из 202). Целесообразность использования этого метода обусловлена тем, что, как и в случае с анализом выживаемости, к моменту завершения исследования выведение было завершено не у всех лиц (цензурированные данные), но они были не исключены, а использованы при анализе. Различия оценивали с использованием лог-рангового критерия.

Методы оценки иммуногенности препарата «ГамЖВК»

Иммуногенность препарата «ГамЖВК» оценивали по индукции специфических IgG- и IgA-антител в сыворотке крови добровольцев, выявляемых с помощью ИФА и РА. Местный иммунный ответ оценивали по динамике специфических секреторных IgA к *B. pertussis* в назальных аспиратах.

Образцы крови отбирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания крови («Vacuette»). Сыворотку крови отбирали после центрифугирования проб в течение 20 мин при 300g для уплотнения сгустка. Уровень специфических IgG- и IgA-антител к возбудителю коклюша в сыворотке определяли с помощью ИФА в соответствии с инструкцией производителя тест-систем «ESR120G», «ESR120A» и «ESR120M» («Virion/Serion GmbH»). IgA в аспиратах, как и в сыворотке крови, определяли с помощью тест-системы «ESR120A» («Virion/Serion GmbH»), но образцы разводили не в 100 (по инструкции производителя), а в 2 раза. Для получения абсолютных значений концентрации антител в аспиратах рассчитанные по калибровочной кривой значения делили на 50.

РА проводили на наборах производства «НПО Эколаб». Титром считали наибольшее разведение сыворотки, при котором получена РА не менее чем на «+++» («три креста»).

Статистическая обработка данных

Математико-статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов «Statistica 10.0», R 4.2.1 и «Microsoft Office Excel 2013» для формирования графиков и таблиц.

Полученные количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения. Для определения нормальности использовали критерий Колмогорова–Смирнова (при численности выборки более 50 добровольцев) или критерий W Шапиро–Уилка (при численности выборки менее 50 добровольцев). Если статистика значима, то гипотеза о нормальном распределении значений переменной отвергалась.

Оценку иммуногенности в исследуемых группах, представленных качественными признаками (долями), проводили с использованием критерия теста χ^2 при ожидаемой частоте встречаемости признака более 5 или двустороннего точного критерия Фишера при несоблюдении условия для критерия χ^2 .

Точки иммуногенности для качественных показателей представлены в виде абсолютных частот (встречаемость признака), относительных частот (%) и 95% доверительного интервала доли (по Клопперу–Пирсону).

Количественные критерии иммуногенности оценивали с использованием непараметрических методов (критерий Манна–Уитни) или t-критерия Стьюдента для независимых выборок в соответствии с характером распределения. Также с учётом характера распределения осуществляли представление данных.

Для сравнения нескольких независимых выборок (более 2), представленных количественными переменными, применяли ранговый анализ вариаций по Краскелу–Уоллису. В случае установления статистически значимых различий между всеми группами для выявления различий между отдельными группами использовали апостериорный метод «Сравнение средних рангов для всех групп» (непараметрический тест Данна), учитывающий проблему множественных сравнений.

Дополнительно к показателям описательной статистики, приведённым для безопасности, для представления титров агглютинации использовали среднегеометрические значения с 95% доверительными интервалами.

Для сравнения групп добровольцев после 1-го и 2-го введений бактерий использовали лог-ранговый критерий.

Для точек иммуногенности применяли двусторонние критерии.

Величина ошибки для подтверждения нулевой гипотезы должна быть больше 0,05 (при $p \leq 0,05$ нулевая гипотеза отклоняется, при $p > 0,05$ — принимается).

Результаты

Динамика специфических противокклюшных IgG- и IgA-антител в сыворотке крови и IgA-антител в назофарингеальных и ротоглоточных аспиратах. Результаты измерений IgG и IgA по подгруппам представлены на **рис. 1, 2**. Значимость статистических различий между общей группой вакцинированных и плацебо оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Оценку статистически значимых различий между подгруппами проводили с использованием непараметрического дисперсионного анализа — ранговый анализ вариаций по Краскелу–Уоллису и апостериорный непараметрический тест Данна (таблицы не приведены).

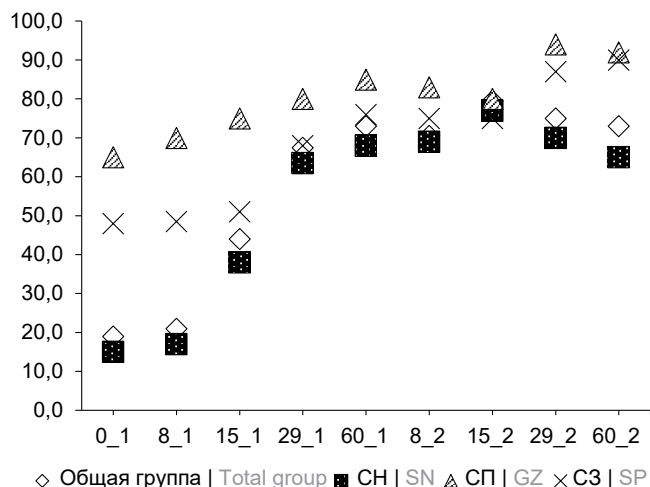


Рис. 1. Динамика специфических противококлюшных IgG-антител в сыворотке крови вакцинированных добровольцев и в подгруппах СН, СЗ и СП.

Здесь и на рис. 2–4 по оси абсцисс — сроки наблюдения за добровольцами в подгруппах после введения «ГамЖВК»: 0_1 — до введения препарата; 8_1, 15_1, 29_1, 60_1 — 8, 15, 29 и 60-й дни после 1-го введения «ГамЖВК» соответственно; 8_2, 15_2, 29_2, 60_2 — 8, 15, 29, 60-й дни после 2-го введения «ГамЖВК» соответственно.

По оси ординат — концентрация IgG в сыворотке крови добровольцев, МЕ/мл.

Fig. 1. *B. pertussis*-specific IgG antibody dynamics in blood serum of vaccinated volunteers and additional groups SN, GZ and SP.

Here and on the Figs. 2–4: days after administration of GamLPV to volunteers from additional groups are plot on X-axis: 0_1 — the 1st day of administration of GamLPV (before administration), 8_1, 15_1, 29_1, 60_1 — 8, 15, 29 and 60 days after the 1st administration of GamLPV respectively; 8_2, 15_2, 29_2, 60_2 — 8, 15, 29, 60 days after the 2nd administration of GamLPV respectively. IgG antibody concentration (IU/mL) in the blood serum of volunteers is plot on Y-axis.

На момент введения «ГамЖВК» значимые различия IgG-антител между общей группой вакцинированных и группой плацебо отсутствовали. На 8-е сутки после 1-го введения уровень IgG-антител в общей группе вакцинированных достоверно возрос в сравнении с группой плацебо ($p = 0,012$); начиная с 15-го дня после 1-й вакцинации различия между группами стали высоко статистически значимыми ($p < 0,0001$). По сравнению с исходным уровнем (19 МЕ/мл) медианные значения уровня IgG-антител в группе вакцинированных после 1-го введения препарата на 8, 15, 29 и 60-й дни выросли в 1,1, 2,3, 3,6 и 3,8 раза соответственно. После 2-го введения «ГамЖВК» кратность возрастания уровня IgG на 8, 15, 29 и 60-й дни составила 3,7, 4,2, 3,9 и 3,8 раза соответственно (70,5–79,5 МЕ/мл). В группе плацебо медианный уровень IgG-антител достоверно не изменялся и варьировал в течение исследования в диапазоне 16,8–21,0 МЕ/мл.

До 1-го введения «ГамЖВК» медиана уровня IgG в каждой подгруппе (СН, СЗ, СП) достоверно отличалась от медианы общей группы вакциниро-

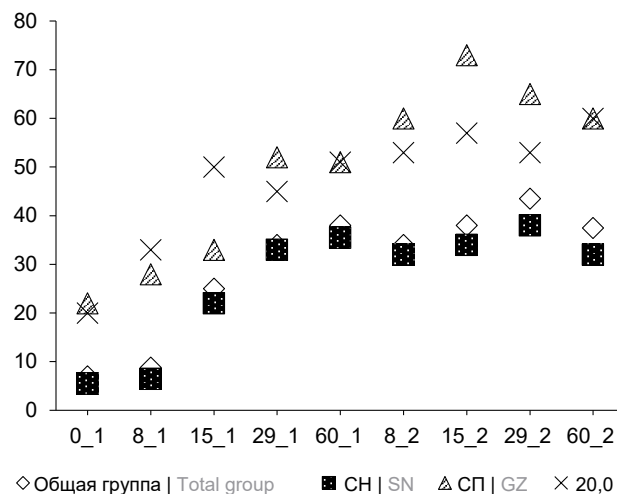


Рис. 2. Динамика специфических противококлюшных IgA-антител в сыворотке крови вакцинированных добровольцев и в подгруппах СН, СЗ и СП.

По оси ординат — концентрация IgA в сыворотке крови добровольцев, МЕ/мл.

Fig. 2. *B. pertussis*-specific IgA antibody dynamics in blood serum of vaccinated volunteers and additional groups SN, GZ and SP.

IgA antibody concentration (IU/mL) in the blood serum of volunteers is plot on Y-axis.

ванных. Достоверные различия отмечены также между подгруппами СН и СП, СН и СЗ. В рамках периода наблюдения медиана уровня IgG-антител в подгруппе СП достоверно отличалась от медианы для общей группы вакцинированных на 15-й день после 1-го введения ($p = 0,001$), а также на 29-й ($p = 0,023$) и 60-й ($p = 0,001$) дни после 2-го введения «ГамЖВК». Достоверные различия между группами СН и СП наблюдались на 15-й ($p = 0,001$) и 29-й ($p = 0,023$) дни после 1-го введения и на 29-й ($p = 0,003$) и 60-й ($p = 0,001$) дни после 2-го введения «ГамЖВК». Уровень IgG-антител в подгруппе СЗ достоверно не отличался от значений для других подгрупп или общей группы вакцинированных ни на одной из контрольных точек после вакцинации.

При оценке уровня специфических IgA-антител в крови установлены достоверные различия между группами вакцинированных и плацебо — 7,0 и 4,8 МЕ/мл соответственно ($p = 0,014$). При этом оба значения были значительно меньше границы серонегативности (< 25 МЕ/мл). После 1-й вакцинации начиная с 8-го дня достоверность различий между группами стала высоко значимой ($p < 0,0001$) и сохранялась на таком уровне до конца исследования. В группе вакцинированных после 1-го введения медианные значения на 8, 15, 29 и 60-й дни возрастали в 1,3, 3,6, 4,9 и 5,4 раза соответственно в сравнении с исходным уровнем. После 2-й вакцинации на 29-й день наблюдался бустерный эффект — уровень IgA-антител вырос в 6,2 раза в сравнении с исход-

ным. К 60-му дню уровень IgA вернулся к уровню, выявленному перед 2-м введением. В группе плацебо существенных изменений за период наблюдения не установлено — медиана значений варьировала в диапазоне 4,0–6,0 МЕ/мл. Анализ подгрупп показал, что на момент перед 1-м введением «ГамЖВК» уровень IgA-антител к *B. pertussis* достоверно различался между подгруппами СП и СН ($p = 0,001$), при этом в подгруппе СП уровень антител достоверно отличался и от значения, характерного для общей группы вакцинированных ($p = 0,001$). На последующих контрольных точках, вплоть до 8-го дня после 2-го введения «ГамЖВК», достоверные различия между подгруппами отсутствовали. На 15-й день после 2-го введения вновь выявлены достоверные различия между подгруппами СП и СН ($p = 0,001$), а также между подгруппой СП и значением для общей группы вакцинированных ($p = 0,001$). На 29-й и 60-й дни после 2-го введения достоверные различия в уровне IgA-антител к *B. pertussis* сохранялись только между группами СП и СН ($p = 0,049$). Для подгруппы СЗ достоверных различий медианы уровня IgA с другими подгруппами не выявлено ни на одной из контрольных точек исследования.

Определение специфических секреторных противококлюшных IgA-антител в носо- и ротоглоточных смывах у добровольцев выявило на всех контрольных точках статистически высоко значимые ($p < 0,0001$) различия между группой вак-

цинированных добровольцев и группой плацебо (рис. 3). В группе вакцинированных по сравнению с исходным уровнем (0,20 МЕ/мл) медиана уровня секреторных IgA-антител на 15, 29 и 60-й дни после 1-й вакцинации увеличилась в 2,5, 4,5 и 3,2 раза соответственно. После 2-й вакцинации этот показатель непрерывно увеличивался, и на 8, 15 и 29-й дни кратность возрастания составила 4,4, 5,2 и 5,8 соответственно. На 60-й день медиана уровня секреторных IgA-антител вернулась к значениям, выявленным на 60-е сутки после 1-го введения «ГамЖВК». Анализ подгрупп показал наличие достоверных различий в уровне секреторных IgA-антител между подгруппами СН и СП на 29-й день после 2-го введения вакцины ($p = 0,031$).

Динамика изменения доли добровольцев с более чем двукратным нарастанием уровня специфических противококлюшных IgA и IgG в сыворотке крови и назальных аспиратах. Кратность возрастания количества специфических противококлюшных IgA и IgG в аспиратах и в сыворотке крови на каждом визите анализировали по сравнению с данными до введения препарата (рис. 4).

Доля добровольцев с минимум двукратным возрастанием уровня IgG-антител в крови в группе вакцинированных достоверно отличалась (тест χ^2 , $p < 0,0001$) от группы плацебо уже на 15-й день после 1-го введения, при этом достоверность различий сохранялась до окончания исследования. На 15, 29 и 60-й дни после 1-го введения и на 8, 15,

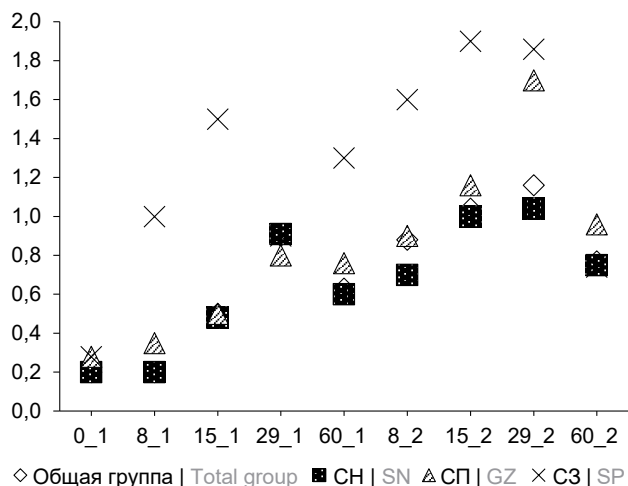


Рис. 3. Динамика медианных значений концентрации специфических секреторных противококлюшных IgA-антител в носо- и ротоглоточных аспиратах у добровольцев в подгруппах СН, СЗ и СП.

По оси ординат — концентрация секреторных IgA-антител в аспиратах, МЕ/мл.

Fig. 3. *B. pertussis*-specific secretory IgA antibody (median values) dynamics in nasopharyngeal/oropharyngeal aspirates of vaccinated volunteers and additional groups SN, GZ and SP.

Secretory IgA antibody concentration (IU/ml) in nasopharyngeal/oropharyngeal aspirates is plot on Y-axis.

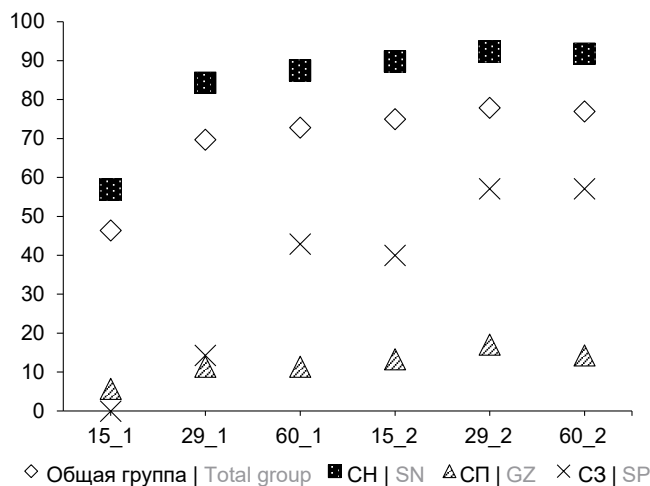


Рис. 4. Динамика доли вакцинированных добровольцев с более чем двукратным нарастанием уровня специфических IgG к *B. pertussis* в сыворотке крови.

По оси ординат — доля добровольцев в исследуемой популяции с более чем двукратным нарастанием значений IgG, %.

Fig. 4. The dynamics of the proportion of vaccinated volunteers with more than a twofold increase of *B. pertussis*-specific IgG antibodies in blood serum.

The proportion of volunteers (%) with more than a twofold increase of *B. pertussis*-specific IgG antibodies in blood serum is plot on Y-axis.

29 и 60-й дни после 2-го введения доля добровольцев, достигших этого показателя, составила 46,4, 69,3, 72,8, 73,1, 75,0, 77,9 и 77,0% соответственно. Анализ подгрупп показал, что в подгруппе СН на 29-й день после 1-го введения доля таких пациентов составила 84,3%. На следующих точках это значение возрастало, достигнув максимума 92,4% на 29-е сутки после 2-го введения. В подгруппах СП и СЗ эти значения в рамках того же периода варьировали в диапазоне 11,4–17,1 и 14,3–57,1% соответственно.

При оценке уровня IgA-антител установлено, что начиная с 15-го дня после 1-го введения и до конца анализа доля пациентов с как минимум двукратным возрастанием уровня IgA-антител в сыворотке крови в группе вакцинированных отличалась от группы плацебо с высокой достоверностью (тест χ^2 , $p < 0,0001$). На 15, 29 и 60-й дни после 1-го введения доля таких добровольцев в группе вакцинированных составила 71,8, 85,1 и 86,1% соответственно. После 2-й вакцинации на 8, 15, 29 и 60-й дни этот показатель в группе вакцинированных составил 88,1, 88,1, 90,0 и 89,0% соответственно. Субанализ подгрупп показал, что в подгруппе СН двукратное возрастание уровня IgA-антител в крови отмечено более чем у 90,0% добровольцев начиная с 29-го дня исследования и до окончания исследования (91,6–94,9%). В подгруппе СП эти значения варьировали в диапазоне 60,0–74,3%, в подгруппе СЗ — 57,1–85,7%.

Динамика уровня секреторных IgA-антител была сходна с таковой IgA-антител в сыворотке крови. Высокодостоверные различия ($p < 0,0001$) между группой вакцинированных и плацебо были выявлены начиная с 15-го дня после 1-го введения вакцины. При этом доля добровольцев с двукратным возрастанием уровня IgA-антител на 15, 29 и

60-й дни после 1-го введения и на 8, 15, 29 и 60-й дни после 2-го введения вакцины составили 58,4, 71,6, 70,8, 80,2, 82,6, 84,0 и 73,5% соответственно. Достоверные различия между подгруппами СН, СЗ и СП отсутствовали, за исключением одной точки — 29 дней после 2-го введения вакцины, на которой подгруппы СН и СП достоверно различались ($p = 0,031$).

Сроки достижения максимальных значений IgA- и IgG-антител в сыворотке крови после 2-й вакцинации в сравнении с 1-й. Для проведения анализа сроков достижения максимальных концентраций анализировали данные только тех добровольцев группы вакцинированных, у которых уровень антител оценивали не менее чем в 3 точках, за исключением времени введения препарата.

После 2-й вакцинации наблюдается достоверное сокращение времени достижения максимальных значений уровня антител: более чем в 2 раза для IgG и в 4 раза для IgA сыворотки крови; в 2 раза для секреторных IgA (таблица).

Оценка иммунного ответа на вакцинацию добровольцев «ГамЖВК» с помощью РА. Оценку иммунного ответа, характеризующего уровень агглютинирующих антител в сыворотке крови вакцинированных добровольцев, осуществляли методом РА. Титры антител представляли в виде среднегеометрических значений с 95% доверительными интервалами и описательных статистик для ассиметрично распределённых данных (таблицы не представлены).

Во всех анализируемых точках установлены статистически значимые различия между группами вакцинированных добровольцев и получивших плацебо. Начиная с 15-го дня после 1-й вакцинации эти различия становились статистически высоко значимы ($p < 0,0001$). Титр антител в группе плацебо

Сравнительная оценка медианных значений концентрации специфических антител IgA и IgG в сыворотке крови и IgA в назофарингеальных/ротоглоточных аспиратах и времени их достижения у вакцинированных добровольцев после 1-й и 2-й вакцинаций

Comparative evaluation of *B. pertussis*-specific IgA and IgG antibody median values in blood serum and secretory IgA antibodies in nasopharyngeal/oropharyngeal aspirates of volunteers with time to Cmax in group of vaccinated volunteers after the 1st and the 2nd vaccination

Класс антител Class of antibodies	Кратность вакцинации Vaccination number	<i>n</i>	Медианное значение содержания специфических антител, ЕД/мл Median value of specific antibody content, IU/mL	<i>p</i> ₁	Медианное значение времени выведения бактерий, день Median value of bacterial elimination time, day	<i>p</i> ₂
IgA в сыворотке крови Serum IgA	1	207	44,0	0,006	56,0	< 0,0001
	2	200	55,5		14,0	
IgG в сыворотке крови Serum IgG	1	208	77,5	< 0,0001	59,0	< 0,0001
	2	200	90,0		28,0	
IgA в аспиратах Secretory IgA	1	208	1,98	< 0,0001	28,0	< 0,0001
	2	199	6,28		14,0	

Примечание. Достоверность различий рассчитывали по критерию Вилкоксона.

Note. Reliability of differences was calculated using the Wilcoxon test.

бо существенно не изменялся на протяжении всего периода обследования.

В группе вакцинированных среднегеометрический титр агглютинации на 8-й день после 1-й вакцинации (45,9) в целом соответствовал исходному уровню (42,4). Рост титра наблюдали начиная с 15-го дня после 1-го введения вакцины. Кратность увеличения среднегеометрического титра агглютинации на 15, 29 и 60-й дни составила 1,7, 2,3 и 2,0 соответственно. После 2-й вакцинации на 8, 15 и 29-й дни кратность составила 2,0, 2,6 и 2,7 соответственно. К 60-му дню после 2-й вакцинации титр незначительно снизился, но кратность увеличения (2,6) превысила аналогичный показатель на 60-й день после 1-й вакцинации.

Доля добровольцев с титром агглютинации 1 : 80 и выше на 8, 15, 29 и 60-й дни после 1-й вакцинации составила 38,1, 56,0, 73,6 и 65,8%, а после 2-й — 66,8, 77,6, 77,6 и 80,0%. После 1-й вакцинации доля добровольцев с титром агглютинации 1 : 80 в общей группе вакцинированных статистически значимо различалась с выделенными подгруппами. После 2-й вакцинации статистически значимых различий между подгруппами не установлено. Наиболее высокий процент лиц, соответствовавших заданному критерию, установлен в группе СП-добровольцев (от 80,0% на 15-й день после 1-го введения до 94,3% на 15-й и 60-й дни после 2-го введения вакцины). В подгруппе СН для того же временного промежутка данный показатель варьировал в диапазоне 51,5–75,9%, в подгруппе СЗ — 42,9–100,0%.

Время элиминации аттенуированных бактерий из носоглотки после 2-го введения бактерий в сравнении с 1-й вакцинацией. На рис. 5 представлена динамика элиминации аттенуированных бактерий из носоглотки как уменьшение кумулятивной доли лиц с невыведенными бактериями *B. pertussis* в отдельные временные интервалы. Из представленных данных видно, что элиминация вакцинных аттенуированных бактерий *B. pertussis* из носоглотки после 2-го введения бактерий происходит быстрее, чем после 1-й вакцинации добровольцев. При этом после 2-го введения вакцины больше доля добровольцев, у которых процесс элиминации завершился в ранние сроки — в течение первых 7 дней после введения.

Сравнительная оценка времени элиминации аттенуированных бактерий из носоглотки вакцинированных добровольцев общей группы после 1-й и 2-й вакцинаций с использованием лог-рангового критерия показала статистически высоко значимое ($p < 0,0001$) снижение продолжительности элиминации после 2-й вакцинации — с 16 до 7 дней по медианному значению. В подгруппе СН выявлена наибольшая разница в продолжительности периода элиминации бактерий после 1-й и 2-й вакцина-

ций — 28 и 7 дней соответственно. В подгруппе СП различия также были достоверны ($p = 0,013$) — медиана продолжительности элиминации бактерий составила 14 и 7 дней соответственно.

Дополнительно к анализу времени элиминации проводили оценку суммарного количества ДНК *B. pertussis* в носоглотке добровольцев в процессе наблюдения после 1-й и 2-й вакцинаций, рассчитанного с использованием методом линейных трапеций. Площадь под кривой после 1-й вакцинации составила 6714 (1539) ГЭ день/мл, после 2-й вакцинации — 443 (44) МЕ день/мл по медиане при расчёте в интервале с 3-го по 60-й день.

Обсуждение

Результаты изучения иммуногенности «ГамЖВК» и вирулентных бактерий *B. pertussis* на экспериментальной модели низших обезьян показали, что первый контакт с инфекцией индуцировал медленный и невыраженный рост специфических IgG, продолжающийся, как правило, до 46–60-го дня наблюдения. Повторное введение бактерий приводило к быстрому и выраженному росту IgG начиная с 3–7-го дня с достижением максимума на 14–28-й день после 2-го инфици-

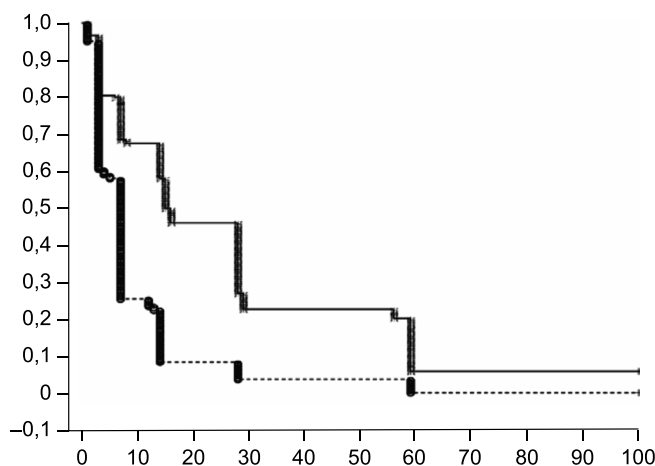


Рис. 5. Динамика кумулятивной доли добровольцев с неэлиминированными из носоглотки бактериями *B. pertussis* после 2-го введения бактерий в сравнении с 1-й вакцинацией.

По оси абсцисс — время элиминации бактерий, начиная от 1 ч после введения «ГамЖВК»; по оси ординат — кумулятивная доля добровольцев, в аспиратах которых методом ПЦР выявлена ДНК бактерий *B. pertussis* в количестве больше 0,7 ГЭ/мл. Штриховой линией обозначен график повторной вакцинации добровольцев.

Fig. 5. The dynamics of cumulative fraction of volunteers who did not eliminate *B. pertussis* bacteria from the nasopharynx after second administration of bacteria compared with the first vaccination.

Time duration of *B. pertussis* bacteria elimination starting from the first hour after GamLPV administration are plot on X-axis; the cumulative fraction of volunteers in whose aspirates the DNA of *B. pertussis* bacteria was detected by PCR in an amount more than 0,7 GE/mL, is plot on Y-axis. The dashed line indicates the second vaccination schedule of volunteers.

рования [6, 7]. Результаты I этапа клинического исследования «ГамЖВК» подтвердили медленное нарастание значений IgG после 1-й вакцинации [8]. Тогда же было показано, что, по крайней мере среди добровольцев Москвы и Московской области при использовании набора «Ridascreen», СН являются менее 50% взрослых в возрасте 40–60 лет [8–10].

Тестируемая вакцина в перспективе предназначена для ревакцинации взрослых независимо от состояния их здоровья и уровня специфических IgG, поэтому практический интерес представляет изучение переносимости, иммуногенности и защитной активности «ГамЖВК» для добровольцев 18–65 лет, не имеющих явного нарушения здоровья, симптомов коклюша и уровень IgG в сыворотке крови, меньший порога, определённого в стране для лабораторной диагностики коклюша. Отсутствие исследований в России, определяющих серологический статус населения (уровень IgG, IgM и IgA), и собственных тест-систем ИФА не позволяет количественно оценить уровень защитных антител после вакцинации и/или перенесённого заболевания. Поэтому, по результатам наших предыдущих исследований и некоторых данных отечественной литературы, в качестве порогового для включения в исследование принято значение IgG 45 ЕД/мл [9, 10], измеренное с помощью набора «Ridascreen», позволившее включить в исследование более 80% скринированных добровольцев. Невозможность использования тест-систем «Ridascreen» в представленном в этой статье исследовании привела к необходимости определения коэффициента пересчёта величины граничной точки критерия включения IgG < 45 ЕД/мл в международные единицы (МЕ/мл), измеряемые с помощью доступной и зарегистрированной в России тест-системы «ESR120G» («Institut Virion/Serion GmbH»). В результате полуэмпирических расчётов в качестве такого коэффициента принято значение, равное 2,8. Таким образом, в качестве верхней границы уровня IgG, при котором доброволец может быть включён в исследование, был принят уровень 126 МЕ/мл, определённый с помощью тест-системы «ESR120G» («Institut Virion/Serion GmbH»). Рассчитанный коэффициент использовали только для определения границы в критерии включения. Все остальные значения параметров IgG и IgA сыворотки крови добровольцев и в аспиратах определяли с помощью тест-систем «ESR120A» «ESR120G» («Institut Virion/Serion GmbH») в используемых ими единицах (МЕ/мл).

Выбор параметров и критериев (контрольных точек) для оценки иммуногенности «ГамЖВК» интраназального применения по основным показателям является традиционным для многоцентровых исследований и обоснован в протоколах, брошюрах и отчётах о проведённых клинических иссле-

дованиях. Контрольные точки, характеризующие уровень иммуногенности препарата, приведены в Приложении к статье на сайте журнала.

Проведённое исследование продемонстрировало достоверную сероконверсию по IgG- и IgA-антителам в сыворотке крови и возрастание уровня секреторных IgA-антител в назальных аспиратах добровольцев. Полученные значения превышали исходный уровень антител у добровольцев, включённых в группу вакцинированных, и уровень антител у добровольцев группы плацебо. Достоверные различия между уровнями IgG- и IgA-антител в группах вакцинированных и плацебо наблюдали уже на 8-й день. Таким образом, гуморальный иммунный ответ на интраназальную вакцинацию добровольцев «ГамЖВК» начинает проявляться через неделю после введения препарата. Максимальное возрастание медианных значений уровней антител к *B. pertussis* в сыворотке крови добровольцев составило для IgG 6,2 раза, для IgA — 4,2 раза. Уровень IgA в аспиратах максимально возрастал в 5,8 раза после 2-й вакцинации. Аналогичная динамика зарегистрирована при оценке сероконверсии по показателю РА.

Показательным является время достижения максимальных уровней IgG- и IgA-антител в сыворотке крови и секреторных IgA-антител в назальных аспиратах после 1-й и 2-й вакцинаций добровольцев. Во всех случаях после 2-го введения препарата уровни антител, независимо от изотипа, не только превышали уровни после 1-го введения, но и достигали максимума в более короткие сроки.

Важным показателем является доля добровольцев, достигших заданного значения превышения исходного уровня антител. Выбранная нами и внесённая в протокол контрольная точка предполагает достижение не менее чем двукратного роста уровня IgG- и IgA-антител не менее чем у 80% вакцинированных добровольцев. При расчёте на общую группу эта контрольная точка была достигнута и превышена в отношении уровня IgA в сыворотке и в аспиратах. Для IgG двукратное возрастание уровня антител отмечено у 77,9% вакцинированных добровольцев.

Анализ динамики изменения уровня IgG- и IgA-антител в сыворотке крови по подгруппам подтвердил общую динамику возрастания уровня IgA- и IgG-антител. Вполне ожидаемо кратность возрастания в общей группе вакцинированных и подгруппе СН оказались близка друг к другу и значимо превышала кратность возрастания в подгруппах С1 и С3 (рис. 4), что обусловлено эффектом базы (исходного уровня антител, относительно которого рассчитывали кратность). Незначительное отставание доли добровольцев, достигших двукратного возрастания уровня IgG-антител от 80%

в общей группе вакцинированных, полностью объясняется наличием в ней добровольцев подгрупп СП и СЗ с исходно высокими значениями IgG и, соответственно, невозможностью достижения ими высокой кратности прироста антител. Так, на 29-й день после 2-й вакцинации доля добровольцев с двукратным и более возрастанием уровня IgG-антител в сыворотке крови среди всех вакцинированных составила 77,9%, тогда как в подгруппе СН этот уровень превышал 92%, в подгруппе СП составил всего 17,1%, а в подгруппе СЗ — 57,1%. Подгруппы СП и СЗ суммарно составляют порядка 20% от общей группы вакцинированных, что повлияло на итоговое значение и определило минимальное значение (2,1%) этого показателя, которого не хватило для достижения заявленной первичной конечной точки в 80,0% пациентов с двукратным возрастанием уровня IgG-антител.

Следует отметить, что выбранный нами уровень 80% и достижение этого уровня при двукратной сероконверсии были определены по результатам предыдущего этапа исследования, в которого включали только СН по IgG-антителам добровольцев. Как видно из полученных данных, в группе СН заявленный показатель был достигнут [8–10]. Более того, в аналогичных экспериментах, проведённых в процессе клинических исследований вакцины BPZE1, авторы рассчитывали долю пациентов с 1,5-кратным приростом уровня антител и достигли контрольной точки только при этом критерии [13]. Перерасчёт наших значений для 1,5-кратного прироста показал достижение в проведённом нами исследовании этого параметра более чем у 80% добровольцев начиная с 29-го дня после 1-го введения «ГамЖВК».

Оценка иммуногенности «ГамЖВК» с помощью РА не выявила значимых различий с результатами, полученными методом ИФА, за исключением более выраженного роста доли добровольцев с титром агглютинации 1 : 80 и выше в подгруппе СП в сравнении с СН, тогда как динамика уровня IgA- и IgG-антител в этих группах носит обратный характер. Достоверность и биологический смысл выявленных различий требуют дальнейшего исследования. Обобщение результатов анализа сыворотки крови добровольцев в двух клинических исследованиях кандидатной вакцины «ГамЖВК», а также данных, полученных при изучении обезьян, иммунизированных «ГамЖВК» и/или экспериментально инфицированных вирулентными бактериями возбудителя коклюша, показало, что ИФА и РА в целом выявляют общую картину иммунологических реакций организма на иммунизацию и экспериментальную инфекцию. Использование РА в большинстве случаев не выявило значимых отличий от результатов, полученных с помощью ИФА, а различия в результатах РА, полученных с исполь-

зованием разных серий препарата, при хорошей воспроизводимости результатов ИФА указывают на низкую стандартизацию наборов, использованных для постановки РА. Полученные результаты делают нецелесообразным использование РА в дальнейших клинических исследованиях «ГамЖВК». Безальтернативность ИФА для определения серологического статуса больных и вакцинированных людей ещё раз подчёркивает необходимость разработки и производства отечественной тест-системы ИФА для количественного определения антител к основным антигенам возбудителя коклюша.

Не выявлено достоверных различий в значениях по подгруппам в уровне секреторных IgA-антител в аспиратах, тогда как уровни IgA- и IgG-антител в сыворотке крови по подгруппам достоверно отличались, в том числе до начала эксперимента, что особенно выражено при сравнении подгрупп СН и СП. Выявленные различия в медианных значениях уровня IgA-антител в сыворотке крови до вакцинации, по-видимому, обусловлены наличием корреляции между уровнем IgG и IgA у добровольцев и отражают последствия предшествовавшего контакта с антигенами *B. pertussis*.

Динамика доли добровольцев с более чем двукратным нарастанием IgA в аспиратах достоверно не отличалась в подгруппах и достигала контрольных значений 80% на 15–29-й день после 2-й вакцинации. Отмеченная особенность может указывать на относительную независимость формирования местного иммунитета от исходного уровня IgG. Вторая вакцинация усиливает местный ответ независимо от серологического статуса добровольца, что ещё раз указывает на крайне важную роль местной иммунной защиты в формировании противобактерийного иммунитета при коклюше. На это же указывают результаты определения бактериальной нагрузки в носо- и ротоглотке вакцинированных добровольцев в динамике. Для каждой из подгрупп, за исключением СЗ, отмечено резкое сокращение времени выведения бактерий после 2-й вакцинации и отсутствие выраженной разницы в значениях параметров для разных подгрупп добровольцев.

Дополнительным к времени выведения бактерий, применительно к оценке противобактерийной активности «ГамЖВК», можно считать количество бактерий, зарегистрированных у добровольцев за период наблюдения после 1-й и 2-й вакцинаций. Это значение оценено нами по результатам расчёта площади под кривой элиминации бактерий после каждой иммунизации. Анализ представленных данных свидетельствует о том, что эффективность элиминации за период с 3-го по 60-й день после 2-й вакцинации была в 33 раза выше по сравнению с 1-м введением вакцины. Поскольку для развития иммунного ответа необходимо время, наиболее

адекватным является определение площади под кривой не с 1-х суток, когда организм не успел ещё среагировать на введение бактерий, а в период с 3-го по 60-й день. Кроме того, результаты измерения значений IgG и IgA указывают на то, что иммунный ответ организма после 1-й и 2-й вакцинаций проявляется ближе к 8-м суткам после введения бактерий.

Приведённые результаты анализа эффективности элиминации аттенуированных бактерий после 2-го введения вакцины позволяют предположить, что уровень специфических IgG- и IgA-антител в сыворотке крови не отражает в полной мере уровень противобактериальной защитной активности. Это соответствует утверждению об отсутствии корреляций между уровнем IgG в сыворотке и защитной активностью коклюшных вакцин на практике [5]. Приведённое утверждение, на первый взгляд, ограничивает использование показателей уровня сывороточных IgG- и IgA-антител в исследованиях по оценке иммуногенности коклюшных вакцин. Сероконверсия, безусловно, является важной характеристикой гуморального иммунного ответа при коклюше или вакцинации, а выработанные антитела участвуют в формировании иммунной защиты, направленной на нейтрализацию токсической активности возбудителя и предотвращение клинических проявлений заболевания, однако она не свидетельствует о формировании стерильного противобактериального иммунитета, как после переболевания коклюшем или вакцинации живой коклюшной вакциной. Общепринятым сегодня является утверждение, что за формирование противобактериальной защиты при коклюше отвечает клеточная составляющая иммунитета. Прямые эксперименты на обезьянах демонстрируют, что наличие всех изотипов специфических антител к коклюшному токсину, филаментозному гемагглютиниру, пертактину и фимбриям после их иммунизации БКВ не обеспечивает предотвращение или хотя бы сдерживание размножения вирулентных бактерий в носоглотке после экспериментальной инфекции животных [5]. Продемонстрированное нами отсутствие зависимости времени выведения бактерий от исходного уровня IgG и IgA в сыворотке крови перед вакцинацией может рассматриваться в качестве дополнительного аргумента в пользу сделанного предположения. Для оценки индуцированного противобактериального ответа, вероятнее всего, следует использовать данные по уровню IgA-антител в рото- и носоглоточных смывах и параметры клеточного ответа, прежде всего, характеризующие ответ Th17.

Недавно опубликованные результаты клинического исследования вакцины BPZE1 в целом соответствуют представленным в настоящем исследовании [13]. Кроме того, они содержат сопоставление показателей иммунного ответа, индуцированного

BPZE1 и АаКДС. По мнению авторов, уровень сероконверсии после интраназальной вакцинации добровольцев BPZE1 несколько ниже, но сопоставим со значениями IgG и IgA в сыворотке крови добровольцев после вакцинации АаКДС. В то же время инъекционная вакцинация АаКДС, в отличие от интраназальной BPZE1, не способна индуцировать специфические секреторные антитела в носоглотке добровольцев. Продемонстрирована хорошая переносимость вакцины BPZE1 и безопасность её интраназального применения у взрослых добровольцев.

Заключение

Результаты проведённого исследования показали иммунологическую эффективность (иммуногенность) живой коклюшной вакцины «ГамЖБК» при двукратном и однократном интраназальном применении в сравнении с плацебо у взрослых добровольцев. Основанием послужило достижение контрольных точек иммуногенности вакцины:

- доля добровольцев с более чем двукратным нарастанием уровня IgG- и IgA-антител в сыворотке крови после вакцинации составила более 80%;
- доля добровольцев с титром агглютинации 1 : 80 в РА после вакцинации составила более 80%;
- доля добровольцев с более чем двукратным нарастанием уровня IgA-антител в носо- и ротоглоточных аспиратах после вакцинации составила более 80%;
- показано статистически значимое снижение сроков достижения максимальных значений IgA-антител в сыворотке крови и носо- и ротоглоточных аспиратах после 2-й вакцинации в сравнении с 1-й и сокращение времени элиминации аттенуированных бактерий из носоглотки после 2-го введения бактерий в сравнении с 1-й вакцинацией добровольцев, оценённое по количеству ГЭ (с помощью ПЦР-РВ).

Различия в доле добровольцев с более чем двукратным увеличением уровня IgG у СН-добровольцев (более 90%) и доле СП-добровольцев (менее 78%) обусловлено изначально высоким уровнем антител у последних и, соответственно, отсутствием его удвоения после следующего контакта с инфекцией. Рост доли добровольцев с более чем двукратным увеличением уровня IgA и IgG происходит в основном за счёт СН-добровольцев с более низким первичным уровнем IgA.

Вклад СН- и СП-добровольцев в долю добровольцев с более чем двукратным ростом секреторных IgA (более 80%) примерно одинаков при близких начальных значениях медианы IgA в каждой из групп, но больших значениях, достигаемых у

СП-добровольцев. Последний результат может указывать на короткий период присутствия секреторных IgA после перенесённой инфекции/вакцинации, но ускоренную их выработку и достижение более высоких значений у СП-добровольцев, имевших ранее контакт с инфекцией.

Сокращение времени элиминации бактерий *B. pertussis* после 2-й вакцинации в сравнении с 1-й в одинаковой степени регистрируется у СН- и СП-добровольцев и составляет 2,0 и 2,3 раза в каждой группе соответственно.

Суммируя представленные результаты, можно утверждать, что уже 1-я интраназальная вакцинация добровольцев приводит к формированию специфического гуморального ответа организма, в том числе выработке специфических секреторных IgA. Повторное введение аттенуированных бактерий *B. pertussis* усиливает иммунный ответ и демонстрирует наличие противобактерийного иммунитета, сформированного в результате 1-й интраназальной вакцинации добровольцев препаратом «ГамЖВК». Для ревакцинации взрослого населения «ГамЖВК» достаточным может оказаться однократное интраназальное введение препарата. Необходимость двукратной вакцинации детей младшего возраста и подростков должна быть определена по результатам клинических исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Decker M.D., Edwards K.M. Pertussis (whooping cough). *J. Infect. Dis.* 2021;224(12 Suppl. 2):310–20. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa469>
2. Macina D., Evans K.E. Bordetella pertussis in school-age children, adolescents, and adults: a systematic review of epidemiology, burden, and mortality in the Middle East. *Infect. Dis. Ther.* 2021;10(2):719–38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00440-8>
3. Locht C., Carbonetti N.H., Cherry J.D., et al. Highlights of the 12th International Bordetella symposium. *Clin. Infect. Dis.* 2020;71(9):2521–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa651>
4. Locht C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine.* 2018;36(36):5460–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.055>
5. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014;111(2):787–92. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
6. Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А. и др. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;97(4):312–23. Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., et al. Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model. = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(4):312–23. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3> EDN: <https://elibrary.ru/zcqxpb>
7. Джидарян А.А., Матуа А.З., Медкова А.Ю. и др. Безопасность и иммуногенность препарата живой коклюшной вакцины ГамЖВК интраназального применения на экспериментальной модели детёнышей обезьян вида павиан гамадрил. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(2):203–14. Djidaryan A.A., Matua A.Z., Medkova A.Yu., et al. Safety and immunogenicity of live intranasal pertussis vaccine GamLPV in the experimental infant hamadryas baboon model. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(2):203–14. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-190>
8. Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Семин Е.Г. и др. Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021;98(6):706–20. Medkova A.Yu., Lidzhiyeva A.A., Semin E.G., et al. Immunogenicity of the drug «Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis» (GamLPV) with a single use in healthy volunteers. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2021;98(6):706–20. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-194> EDN: <https://elibrary.ru/jkxdrn>
9. Медкова А.Ю., Лиджиева А.А., Семин Е.Г. и др. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):114–9. Medkova A.Yu., Lidzhiyeva A.A., Semin E.G., et al. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccine for the prevention of pertussis. *Drug Development & Registration.* 2021;10(1):114–9. DOI: <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-11> EDN: <https://elibrary.ru/ivumga>
10. Каратаев Г.И., Медкова А.Ю., Семин Е.Г. и др. Разработка способа и схемы применения живой рекомбинантной коклюшной вакцины «ГамЖВК». Безопасность и переносимость двукратной интраназальной вакцинации здоровыми взрослыми добровольцами. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):202–8. Karataev G.I., Medkova A.Yu., Semin E.G., et al. Development of a method and a scheme for the use of a live recombinant vaccine «GamLPV». Safety and tolerability of double intranasal vaccination of healthy adult volunteers. *Drug Development & Registration.* 2022;11(3):202–8. DOI: <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-202-208> EDN: <https://elibrary.ru/sytabk>
11. Li R., Lim A., Ow S.T., et al. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine.* 2011;29(33):5502–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.052>
12. Jahnmatz M., Richert L., Al-Tawil N., et al. Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: a phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(11): 1290–301. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30274-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30274-7)
13. Keech C., Miller V.E., Rizzardi B., et al. Immunogenicity and safety of BPZE1, an intranasal live attenuated pertussis vaccine, versus tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine: a randomised, double-blind, phase 2b trial. *Lancet.* 2023;401(10379):843–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02644-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02644-7)
14. Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа rtxP3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018;95(4):33–41. Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., et al. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of

ptxP3 genotype. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(4):33–41.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>

EDN: <https://elibrary.ru/npsjcf>

15. Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Румянцева Ю.П. и др. Накопление авирулентных инсерционных *bvg* мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013;(4):22–6. EDN: <https://elibrary.ru/rtwart>
Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Romyantseva Yu.P., et al. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* *Bvg* mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molecular*

Genetics, Microbiology and Virology. 2013;28(4):156–61.

DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416813040058>

EDN: <https://elibrary.ru/sljrat>

16. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019;11(1):17–24. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Journal Infectology*. 2019;11(1):17–24.
DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
EDN: <https://elibrary.ru/ubtkhkh>

Информация об авторах

Лиджиева Алеветина Анатольевна — м. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1537-6444>

Медкова Алиса Юрьевна — к. м. н., с. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Куликов Сергей Вячеславович — м. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Синяшина Людмила Николаевна — д. м. н., в. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Сюндюкова Резида Анаеровна — к. б. н., с. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5600-1967>

Марков Андрей Петрович — к. б. н., с. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-1857-967X>

Верведа Алексей Борисович — к. м. н., в. н. с. Научно-исследовательского института промышленной и морской медицины, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с. ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4029-3170>

Абаева Наталья Евгеньевна — н. с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3984-959X>

Чернышова Ирина Николаевна — к. м. н., с. н. с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Гаврилова Марина Викторовна — к. б. н., н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, н. с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>

Бушкова Кристина Константиновна — н. с. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4757-0751>

Дьяков Илья Николаевич — к. б. н., н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, в. н. с., зав. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Каратаев Геннадий Иванович — д. б. н., в. н. с., рук. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Участие авторов: *Лиджиева А.А.* — планирование и проведение эксперимента, отработка протоколов обследования добровольцев, координация данных из исследовательского центра; *Медкова А.Ю.* — разбор спорных случаев, связанными с нежелательными явлениями у добровольцев, редактирование и оформление текста рукописи для печати; *Куликов С.В.* — проведение ПЦР-РВ анализа, анализ литературных данных; *Синяшина Л.Н.* — критические замечания при прочтении рукописи, формирование концепции исследования, идеи методов введения препарата, ре-

Information about the authors

Alevtina A. Lidzhiyeva — junior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1537-6444>

Alisa Yu. Medkova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Sergey V. Kulikov — junior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Ludmila N. Sinyashina — D. Sci. (Med.), leading researcher of laboratory of bacterial genetics of the department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Rezida A. Sioundiukova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5600-1967>

Andrey P. Markov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-1857-967X>

Aleksey B. Verveda — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Research Institute of Industrial and Maritime Medicine, Saint-Petersburg, Russia; senior researcher, Eco-Safety Research Center LLC, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4029-3170>

Natalia E. Abaeva — researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3984-959X>

Irina N. Chernyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5053-2433>

Marina V. Gavrilova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6936-2486>

Kristina K. Bushkova — researcher, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4757-0751>

Ilya N. Dyakov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; leading researcher, Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

Gennady I. Karataev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, head of the laboratory of bacterial genetics of the department of medical microbiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

дактирование рукописи; *Сюндюкова Р.А.* — обсуждение полученных результатов; *Марков А.П.* — анализ литературных данных, обсуждение полученных результатов; *Верведа А.Б.* — статистический анализ данных; *Абаева Н.Е., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К.* — подготовка образцов крови и смывов из рото/носоглотки, постановка иммуноферментного анализа для оценки уровня антител в сыворотке крови и смывах, проведение реакции агглютинации; *Дьяков И.Н.* — формирование концепции, планирование исследования, анализ литературных данных, обработка экспериментальных данных, написание рукописи; *Каратаев Г.И.* — формирование концепции, планирование исследования, написание и редактирование рукописи, окончательная формулировка выводов и утверждение версии статьи для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.09.2024;
принята к публикации 24.09.2024;
опубликована 30.12.2024

Author contribution: *Lidzhieva A.A.* — planning and conducting an experiment, working out protocols for examining volunteers, coordinating data from the research center; *Medkova A.Yu.* — analysis of controversial cases related to adverse events in volunteers, editing and formatting the text of the manuscript for printing; *Kulikov S.V.* — conducting PCR-RV analysis, analysis of literary data; *Sinyashina L.N.* — critical remarks when reading the manuscript, formation of the research concept, ideas of drug administration methods, editing of the manuscript; *Syundyukova R.A.* — discussion of the results; *Markov A.P.* — analysis of literary data, discussion of the results; *Verveda A.B.* — statistical analysis of data; *Abayeva N.E., Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Bushkova K.K.* — preparation of blood samples and flushes from the mouth/nasopharynx, setting up an enzyme immunoassay to assess the level of antibodies in blood serum and flushes, conducting an agglutination reaction; *Dyakov I.N.* — formation of the concept, planning of the study, analysis of literature. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.09.2024;
accepted for publication 24.09.2024;
published 30.12.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>



Селективное подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* с помощью наноконструкций, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола

Репкова М.Н.¹, Левина А.С.¹, Мазурков О.Ю.², Макаревич Е.В.², Филиппова Е.И.², Мазуркова Н.А.², Зарытова В.Ф.^{1✉}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Аннотация

Актуальность. Вирусы гриппа, относящиеся к семейству *Orthomyxoviridae*, широко распространены в природе и часто являются причиной возникновения пандемий. Появление новых штаммов вируса, устойчивых к лекарственным препаратам, вызывает потребность в разработке новых эффективных лекарственных форм, селективно действующих на вирусы гриппа А.

Цель работы — создание наноконструкций, состоящих из наночастиц аминопропилсиланола (АПС) и малых интерферирующих РНК (siRNA), и исследование их воздействия на нуклеиновые кислоты-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Материалы и методы. В работе использовали клетки MDCK, вирус гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), наночастицы АПС, нативные и модифицированные молекулы siRNA.

Результаты и обсуждение. Созданы уникальные наноконструкции Si-NH₂/siRNA, состоящие из наночастиц АПС и иммобилизованных на них молекул siRNA, обеспечивающих соответственно проникновение в клетки и селективное взаимодействие с нуклеиновыми кислотами-мишенями. Противовирусную активность предложенных наноконструкций исследовали на клетках MDCK, заражённых вирусом гриппа A/H5N1. Показано, что двухцепочечные молекулы siRNA в составе наноконструкций, действующие по механизму РНК-интерференции, более эффективно подавляют репликацию вируса гриппа по сравнению с соответствующими одноцепочечными фрагментами РНК. Наиболее эффективный наноконструкция, содержащий siRNA, нацеленную на выбранный участок 5-го сегмента мРНК вирусного генома, снижал репликацию вируса гриппа А в культуре клеток в 630 раз. Показано, что неагломерированные, растворимые в водных растворах наночастицы АПС являются малотоксичными, способными доставлять siRNA в клетки и защищать siRNA в составе наноконструкций Si-NH₂/siRNA от гидролиза клеточными нуклеазами.

Заключение. Продемонстрирована высокая биологическая активность созданных наноконструкций на примере селективного и высокоэффективного подавления репликации вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 в клеточной системе.

Ключевые слова: наночастицы аминопропилсиланола, наноконструкции, siRNA, противовирусная активность, вирус гриппа A/H5N1

Благодарность. Авторы благодарят М. Мещанинову (лаборатория химии РНК Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за синтез олигорибонуклеотидов и их модифицированных аналогов.

Источник финансирования. Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 23-25-00230).

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

Для цитирования: Репкова М.Н., Левина А.С., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф. Селективное подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* с помощью наноконструкций, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):794–802.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>
EDN: <https://www.elibrary.ru/rnwecce>

Selective suppression of influenza A/H5N1 virus replication *in vitro* using nanocomplexes consisting of siRNA and aminopropylsilanol nanoparticles

Marina N. Repkova¹, Asya S. Levina¹, Oleg Yu. Mazurkov², Elena V. Makarevich², Ekaterina I. Filippova², [Natalya A. Mazurkova](#)², Valentina F. Zarytova^{1✉}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Abstract

Relevance. Studies on model systems have confirmed the effectiveness of antisense oligonucleotides, including those that contain photoactive groups, for the modification of nucleic acids. However, this strategy has not yet found wide application due to the lack of successful methods for the intracellular delivery. The development of effective preparations capable of acting on target nucleic acids in cells is an urgent task.

The aim of the study is to create nanocomplexes consisting of aminopropylsilanol nanoparticles and short interfering RNA (siRNA) to study their effect on target nucleic acids by the example of inhibition of influenza A virus replication *in vitro*.

Materials and methods. MDCK cells, influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), aminopropylsilanol nanoparticles, and native and modified siRNA molecules.

Results and discussion. We have prepared unique Si-NH₂/siRNA nanocomplexes, which consist of aminopropylsilanol nanoparticles and siRNA molecules, which enable cell penetration and selective interaction with target nucleic acids, respectively. The antiviral activity of the proposed nanocomplexes has been studied on MDCK cells infected with the influenza A/H5N1 virus. It has been shown that the double-stranded siRNA molecules in the nanocomplexes, which act by the RNA interference mechanism, are more efficient in inhibiting the replication of the influenza virus than the corresponding single-stranded RNA fragments. The most effective nanocomplex that contained siRNA targeted at the chosen region of mRNA segment 5 of the viral genome reduced virus replication in the culture by a factor of 630. We have shown that non-agglomerated and water-soluble aminopropylsilanol nanoparticles are low-toxic, capable of delivering siRNA into cells and protecting siRNA in the Si-NH₂/siRNA nanocomplexes from hydrolysis by cellular nucleases.

Conclusion. The biological activity of the created nanocomplexes has been demonstrated by the example of highly effective selective suppression of influenza A/chicken/Kurgan/05/2005 virus replication in the cellular system.

Keywords: *aminopropylsilanol nanoparticles, nanocomplexes, siRNA, antiviral activity, influenza A virus, influenza A/H5N1 virus*

Acknowledgement. The authors thank M. Meshchaninova (Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) for the synthesis of oligoribonucleotides and their modified analogs.

Funding source. The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-00230).

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

For citation: Repkova M.N., Levina A.S., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Selective suppression of influenza A/H5N1 virus replication *in vitro* using nanocomplexes consisting of siRNA and aminopropylsilanol nanoparticles. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):794–802.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>

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

Введение

Терапия с использованием нуклеиновых кислот (НК) предлагает уникальные возможности воздействия на генетический материал клетки. Однако её эффективность ограничена нестабильностью НК по отношению к клеточным нуклеазам и их низкой способностью проникать через цитоплазматическую мембрану, что делает необходимым использование различных систем доставки [1].

Малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты (small interfering RNA, siRNA) — многообещающий тип терапевтических средств на основе РНК, поскольку механизм их действия является каталитическим и каждая молекула siRNA может инактивировать несколько молекул РНК-мишеней. Молекулы siRNA интенсивно исследуются в качестве противовирусных агентов. L. Singh и соавт. представили широкий спектр применения нанораз-

мерных материалов для лечения распространённых вирусных инфекций [2]. Для клинического успеха предлагаемых методов доставки фрагментов НК в клетки безопасность и эффективность остаются жизненно важными требованиями. Предложены различные подходы к решению проблемы доставки siRNA, например, с помощью вирусов, катионных липидов, полимеров, транспортных пептидов. Следует упомянуть успешное использование биоконъюгатов siRNA и N-ацетилгалактозаминов [3]. Однако все методы имеют ограничения для терапевтического использования. Огромное количество потенциальных препаратов на основе siRNA не прошли клинических испытаний, поскольку многие факторы (низкая эффективность доставки siRNA в клетки-мишени, токсичность, деградация siRNA нуклеазами, фильтрация почками, поглощение иммунными клетками, нецелевые эффекты, низкая эффективность проникновения через гидрофобную клеточную мембрану и высвобождение siRNA из эндосом) ограничивают использование siRNA в биомедицине.

Одним из наиболее перспективных подходов к решению проблемы доставки siRNA в клетки является использование невирусных векторов на основе наночастиц (НЧ) [2, 4, 5]. Для доставки siRNA применялись различные типы НЧ. НЧ, состоящие из катионных полимеров (поли-L-лизин, полиамидоамин, полиэтиленимин, хитозан) или липидов, являются наиболее изученными средствами доставки [6, 7]. Учитывая широкое разнообразие доступных материалов, каждый из которых имеет множество потенциальных модификаций, состав НЧ можно оптимизировать для доставки конкретного типа РНК [8–10]. Системы доставки должны удовлетворять ряду важных требований: они должны повышать способность проникновения РНК в клетки, обеспечивать эффективную защиту РНК от деградации клеточными нуклеазами, а также обладать низкой токсичностью.

Несмотря на определённые успехи в разработке методов доставки фрагментов НК в клетки, проблему доставки нельзя считать окончательно решённой. Поэтому целесообразным является поиск других способов доставки siRNA в клетки.

Ранее мы разработали системы доставки олигодезоксирибонуклеотидов и дезоксирибозимов, основанные на использовании НЧ диоксида титана и аминопропилсиланола (АПС), с целью их воздействия на НК-мишени. Показано, что фрагменты ДНК в составе созданных наноконструкций сайт-специфично и эффективно воздействуют на гены-мишени *in vitro* и *in vivo* [11–14].

Цель работы — определить возможность использования неагломерированных, растворимых в водных растворах НЧ АПС для доставки siRNA в клетки в виде наноконструкций Si~NH₂/siRNA, для

эффективного и селективного подавления репликации вируса гриппа A/H5N1.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы от коммерческих поставщиков: (3-аминопропил)триэтоксисилан, трипсин, пенициллин, стрептомицин («Sigma-Aldrich»); среду DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; «Биолот»); эмбриональную телячью сыворотку («Gibco»), МТТ ((3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид), «NeoFroxx»), диметилсульфоксид («Компонент-Реактив»). Трипсин использовали в концентрации 2 мкг/мл, пенициллин и стрептомицин — в концентрации 100 ЕД/мл. Куриные эритроциты, клетки MDCK и штамм вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) были получены из коллекций ГНЦ ВБ «Вектор».

Олигорибонуклеотиды и их производные синтезировали твёрдофазным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе «ASM-800 synthesizer» («Биоссет»), используя оптимизированный протокол для масштаба синтеза 0,4 ммоль. В качестве мономеров использовали 2'-дезокси-, 2'-O-TBDMS- и 2'-O-метил-фосфорамидиты («Glen Research»). Сульфурезующий реагент II («Glen Research») применяли для введения тиофосфатной группы. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрическим методом путём измерения их оптической плотности в растворе с использованием спектрофотометра «Shimadzu U-1800» («Shimadzu»).

Получение наночастиц аминопропилсиланола Si~NH₂ и наноконструкций Si~NH₂/siRNA

НЧ АПС (Si~NH₂) синтезировали путём гидролиза (3-аминопропил)триэтоксисилана, который добавляли по каплям в горячую воду, и смесь перемешивали при этой температуре в течение 15 ч с последующим охлаждением до комнатной температуры [15]. Значение pH полученного раствора (10,6) было доведено до 7,5 с помощью 1 М HCl. Концентрацию конечного раствора Si~NH₂ (0,26 М) определяли титрованием аминогрупп с помощью 1 М HCl. Выход реакции составил 95–97%. НЧ Si~NH₂ ранее изучены физико-химическими методами: динамическое светорассеяние, ультрафиолетовая, инфракрасная спектроскопия, просвечивающая и атомно-силовая микроскопия [15].

Молекулы РНК иммобилизовали на НЧ АПС [16] благодаря электростатическому взаимодействию между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами в олигорибонуклеотидах (р) и положительно заряженными аминогруппами (NH₂) в НЧ. Наноконструкции с одно- и двухцепочечной РНК (соответственно Si~NH₂/RNA и Si~NH₂/siRNA) получали при смешивании RNA или siRNA с 0,26 М Si~NH₂ в воде при условии, что

соотношение NH_2/ρ составляло 50 (мы учитывали количество фосфатных групп только в одной цепи). Размер и дзета-потенциал полученных НЧ АПС и наноконплексов с молекулами РНК измеряли методом динамического светорассеяния на приборе «Zetasizer Nano ZS Plus» («Malvern»).

Анализ токсичности наночастиц и наноконплексов в культуре клеток MDCK

Образцы в среде DMEM (0,1 мл в концентрациях 5–50 мкМ для siRNA или 5–50 мМ для $\text{Si}\sim\text{NH}_2$) вносили в лунки 96-луночных планшетов с клетками MDCK. В качестве контроля использовали клетки в 0,1 мл поддерживающей среды DMEM. После инкубации клеток в течение 2 дней при 37°C и 5% CO_2 культуральную среду удаляли и в каждую лунку вносили МТТ-краситель (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид) в буфере FSB-D (фосфатная соль Дульбекко; 0,075 мл, 1 мг/мл). Клетки инкубировали в течение 90 мин при 37°C, после чего удаляли раствор красителя и добавляли диметилсульфоксид (0,1 мл). После инкубации в течение 10 мин измеряли оптическую плотность в каждой лунке на спектрофотометре «Emax» («Molecular Devices») при длине волны 540 нм, что является показателем количества жизнеспособных клеток в монослое.

Зависимость оптической плотности от концентрации исследуемого образца была представлена в полулогарифмических координатах, а 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}) каждого образца была рассчитана с помощью компьютерной программы «SoftMaxPro-4.0».

Противовирусная активность наноконплексов

Вирус A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при 37°C. Аллантоисную жидкость собирали в течение 48 ч после инокуляции вируса и хранили при –80°C. Клетки MDCK высевали из расчёта 10^5 клеток/мл в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), в 96-луночные планшеты (100 мкл/лунку) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности. После достижения ~80% монослоя среду удаляли и в лунки добавляли образцы $\text{Si}\sim\text{NH}_2$, $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{RNA}$ и $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ в концентрации 0,5 мМ (в отношении $\text{Si}\sim\text{NH}_2$, что соответствует 0,5 мкМ в отношении РНК или siRNA) в 100 мкл среды DMEM. Контрольным образцом была та же среда без наноконплексов. В качестве препарата сравнения использовали озельтамивир в концентрации 10 мкг/мл.

Для экспериментов по исследованию дозозависимости противовирусной активности наноконплексов $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ их концентрация изменялась в диапазоне 0,01–1,00 мкМ (в отношении siRNA).

Клетки инкубировали в присутствии образцов при 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности в течение 4 ч с последующей промывкой клеток той же средой. Затем клетки инфицировали вирусом A/H5N1 в содержащей трипсин (2 мкг/мл) среде DMEM (по 100 мкл в каждую лунку) при множественности заражения 0,01 50% тканевой цитопатической дозы (TCID_{50}) на 1 мл. После адсорбции вируса в течение 1 ч при комнатной температуре среду, содержащую вирус, удаляли, клетки промывали средой DMEM без трипсина и добавляли ту же среду, содержащую трипсин, в каждую лунку по 100 мкл. После инкубации в течение 48 ч последовательные 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) культуральной жидкости, содержащей вирус, из каждой лунки наносили на клетки MDCK с повторной инкубацией в течение 48 ч для последующей оценки титра вируса. Наличие цитопатического действия регистрировали под микроскопом и в реакции гемагглютинации с 1% суспензией куриных эритроцитов. Титр вируса выражали в единицах $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Для оценки зависимости ингибирования вируса от концентрации наноконплексов рассчитывали процент подавления продукции вируса по формуле: $(A - B)/A$, где A — титр вируса в контроле (без образца) в $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$; B — титр вируса в эксперименте (с образцом) в $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы «Statistica v. 12» («StatSoft Inc.»). Титр вируса в контроле и эксперименте (соответственно без или с экспериментальными образцами) рассчитывали с использованием метода Спирмена–Кербера и выражали в $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Различия между результатами с экспериментальными и контрольными образцами считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

НЧ диоксида кремния рассматриваются как перспективные носители для доставки НК в клетки [17]. Чаще всего для иммобилизации НК и их фрагментов используются аминокислотные модифицированные Si-НЧ. Мы синтезировали неагломерированные НЧ АПС (гидродинамический диаметр — ~1 нм, дзета-потенциал — ~10 мВ) [15].

Малый размер частиц $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ обеспечивает получение водорастворимых препаратов. Характеристика НЧ АПС с помощью физико-химических методов описана в нашей предыдущей работе [15]. Показано, что полученные НЧ не склонны к агрегации и могут храниться в течение нескольких месяцев.

Наноконплексы $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{RNA}$ и $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ получены путём электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными между-клеточными фосфатными группами в РНК и siRNA и положительно заряженными протонированными

аминогруппами в НЧ Si~NH₂. Добавление отрицательно заряженных молекул siRNA к НЧ приводит к изменению дзета-потенциала с ~(+10 мВ) до ~(-30 мВ) и размера частиц с ~1 нм до ~200 нм, что свидетельствует об образовании наноконплексов.

В качестве мишени для РНК и siRNA мы выбрали сегмент 5 вируса гриппа А, кодирующий нуклеопротеин, который играет ключевую роль во встраивании вирусного генома в клеточное ядро инфицированного организма, способствуя таким образом дальнейшей репликации и сборке вирусных частиц [18]. Для воздействия siRNA была выбрана область вблизи 3'-конца этого сегмента, начинающаяся с нуклеотида 1496, которая является консервативной и уязвимой к действию siRNA [19–21].

Мы синтезировали 2 нативных (RNA₁ и RNA₂) и 8 модифицированных (RNA–RNA₁₀) олигорибонуклеотидов, содержащих ТТ на 3'-конце (табл. 1). Цепи RNA₃ и RNA₄ содержат ТТ на 3'-конце; RNA₅ и RNA₆ содержат, кроме ТТ на 3'-конце, 2'-Оме группы в сайте U*A в центре цепей. Присутствие группы 2'-О-Ме в этих сайтах повышает устойчивость к сывороточным нуклеазам, тем самым поддерживая интерференционную способность siRNA [22] и обеспечивая долгосрочное подавление экспрессии генов-мишеней [23]. Цепь RNA₇ содержит 2'-О-Ме группы во всех положениях и 2 межнуклеотидные тиофосфатные группы на обоих концах. Цепь RNA₈ отличается от RNA₇ наличием 3 последовательных 2'-F групп в положениях 9–11 от 5'-конца. Олигорибонуклеотиды RNA₂, RNA₄, RNA₆ и RNA₈ являются смысловыми цепями, а RNA₁, RNA₃, RNA₅ и RNA₇ — антисмысловыми цепями, т.е. направленными на (-)РНК и (+)РНК вирусного генома соответственно, RNA₉ и RNA₁₀ являются составными цепями для siRNA, направленной на мРНК зелёного флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) [20].

Синтезированные РНК были использованы для получения наноконплексов Si~NH₂/RNA на

основе неагломерированных НЧ АПС. Исследована их биологическая активность на примере подавления репликации вируса А/Н5N1 в инфицированных клетках МДСК при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все одноцепочечные олигорибонуклеотиды (как смысловые, так и антисмысловые цепи) в составе наноконплексов Si~NH₂/RNA подавляли репликацию вируса гриппа А/Н5N1 на 0,7–1,3 порядка — в 5–20 раз (рис. 1, столбцы 1–8).

Из 4 исследованных смысловых цепей мы выбрали RNA₄, несущую дезоксидинуклеотид ТТ на 3'-конце для защиты от экзонуклеаз, как наиболее активную и сформировали 4 молекулы siRNA со всеми возможными антисмысловыми цепями (RNA_{1/4}, RNA_{3/4}, RNA_{5/4} и RNA_{7/4}). Все siRNA являются дуплексами с одинаковой нуклеотидной последовательностью и разной модификацией нуклеозидных звеньев. Эффективность исследованных siRNA оказалась существенно выше по сравнению с одноцепочечными олигорибонуклеотидами (рис. 1). Наноконплексы Si~NH₂/siRNA, содержащие siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4} и siRNA_{7/4}, подавляли репликацию вируса А/Н5N1 на 2,3–2,8 порядка — в 200–630 раз. Наноконплексы Si~NH₂/siRNA_{9/10}, содержащие неспецифическую для вируса гриппа А siRNA_{9/10}, практически не подавляли репликацию вируса гриппа А (рис. 1), что свидетельствует о высокой специфичности воздействия созданных наноконплексов Si~NH₂/siRNA на вирус гриппа А/chicken/Kurgan/05/2005.

Главная причина отличия в эффективности siRNA и олигорибонуклеотидов заключается в разном механизме их действия. Известно, что олигодезоксинуклеотиды и siRNA подавляют функции целевых РНК за счёт комплементарных взаимодействий с РНК-мишенью с её последующей деградацией клеточными РНКазами (соответственно

Таблица 1. Олигорибонуклеотиды, используемые в данной работе

Table 1. Oligoribonucleotides used in this study

Цепь РНК RNA chain		Нуклеотидная последовательность, 5'-3' Nucleotide sequence, 5'-3'
RNA ₁	Антисмысловая Antisense	CUCCGAAGAAUAAGAUC
RNA ₂	Смысловая Sense	GGAUCUUUUUCUUCGGAG
RNA ₃	Антисмысловая Antisense	CUCCGAAGAAUAAGAUCCTT
RNA ₄	Смысловая Sense	GGAUCUUUUUCUUCGGAGTT
RNA ₅	Антисмысловая Antisense	CUCCGAAGAAU*AAGAUCCCTT
RNA ₆	Смысловая Sense	GGAUCUU*AUUCUUCGGAGTT
RNA ₇	Антисмысловая Antisense	C* _{PS} U* _{PS} C* _{PS} G*A*A*G*A*A*U*A*G*A*U* _{PS} C* _{PS} T
RNA ₈	Смысловая Sense	G* _{PS} G* _{PS} A* _{PS} U* _{PS} U* _{PS} A* _{PS} U* _{PS} U* _{PS} C* _{PS} U* _{PS} C* _{PS} G*A* _{PS} G*A* _{PS} T

Примечание. *2'-О-метильная группа; #2'-фтор группа; PS — межнуклеотидная тиофосфатная группа; символ d для обозначения дезоксириботимидина опущен.

Note. *2'-O-methyl group; #2'-fluoro group; PS — internucleotide thiophosphate group; symbol d for deoxyribotimidine has been omitted.

Титр вируса, Ig ТЦД₅₀/мл
 Virus titer, Ig TCID₅₀/mL

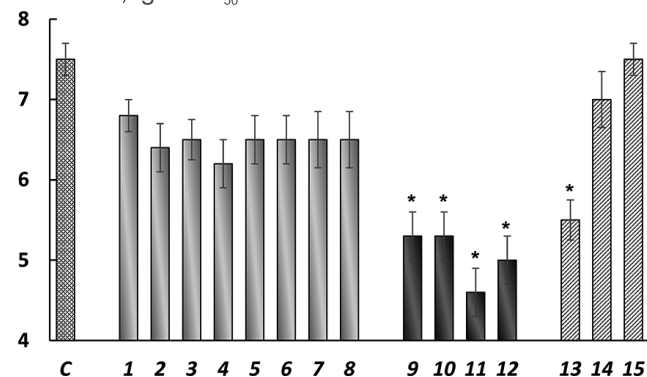


Рис. 1. Титры вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) после инкубирования клеток MDCK с наноконплексами Si~NH₂/RNA и Si~NH₂/siRNA.

С — контроль вируса без образцов. 1–8 — наноконплексы Si~NH₂/RNA, содержащие RNA₁–RNA₈ (концентрация РНК в наноконплексах 0,5 мкМ); 9–12 — наноконплексы Si~NH₂/siRNA, содержащие siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4} и siRNA_{7/4} (концентрация siRNA в наноконплексах 0,5 мкМ в расчёте на одну цепь); 13 — озельтамивир (10 мкг/мл или 32 мкМ); 14 — Si~NH₂ (концентрация частиц 0,5 мМ); 15 — Si~NH₂/siRNA_{9/10} (наноконплекс, содержащий неспецифическую (для вируса гриппа А) siRNA_{9/10}). Множественность заражения — 0,01 ТЦД₅₀/кл. Представленные средние значения, стандартные отклонения и отличия величин титров вируса рассчитаны по методу Спирмена–Кербера. **p* ≤ 0,05 по сравнению с контролем.

Fig. 1. Titers of A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) virus in MDCK cells after their incubation of with Si~NH₂/RNA and Si~NH₂/siRNA nanocomplexes.

С, virus control without samples. Si~NH₂/RNA nanocomplexes containing RNA₁–RNA₈ (1–8), concentration of RNA in nanocomplexes is 0.5 μM; Si~NH₂/siRNA nanocomplexes containing siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4}, and siRNA_{7/4} (9–12), concentration of siRNA in nanocomplexes is 0.5 μM per one strand; ozeltamivir (13), 10 μg/mL or 32 μM; Si~NH₂ (14), 0.5 mM; Si~NH₂/siRNA_{9/10}, nanocomplex containing unspecific siRNA_{9/10} (15). MOI, 0.01 TCID₅₀/cell. The presented average values, standard deviations and differences in the titer values of the virus are calculated using the Spearman–Kerber method. Asterisks designate the difference between the control and the titer values of the virus obtained under the action of the studied series of nanocomplexes, at *p* < 0.05.

РНКазы-Н1 и AGO2) [24–26], что в итоге приводит к утрате функций целевых РНК. Однопочечные РНК-фрагменты могут формировать комплементарные комплексы с РНК-мишенью, но не вызывают деградации целевой РНК. Молекула siRNA сначала связывается с комплексом (RISC), затем удаляется смысловая (пассажирская) цепь. Нуклеаза AGO2 и оставшаяся антисмысловая цепь в составе комплекса RISC находят целевую РНК-мишень, и AGO2 расщепляет её. AGO2 сохраняет антисмысловую цепь в течение некоторого времени в составе комплекса RISC для дальнейших реакций [27–29].

Известно, что siRNA быстро гидролизуются клеточными нуклеазами, для защиты от которых используют различные модификации. Следует отметить, что даже минимально модифицированные siRNA_{1/4} и siRNA_{3/4}, доставленные в клетки в составе наноконплексов с НЧ, весьма эффективно

подавляли репликацию вируса (на 2,3 порядка, ~ в 200 раз). Это означает, что в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA НЧ АПС защищают siRNA от клеточных нуклеаз. Самый активный наноконплекс Si~NH₂/siRNA_{5/4} подавлял репликацию вируса почти на 3 порядка.

Противовирусная активность исследованных наноконплексов Si~NH₂/siRNA была сравнима с активностью озельтамивира (наиболее часто используемого препарата сравнения при исследовании воздействия на вирус гриппа А), но при гораздо меньшей концентрации активного компонента (0,5 мкМ для siRNA и 32 мкМ для озельтамивира). НЧ Si~NH₂, как и следовало ожидать, не приводили к подавлению репликации вируса.

Наиболее активный наноконплекс Si~NH₂/siRNA_{5/4} охарактеризован более подробно. Мы оценили влияние siRNA, НЧ Si~NH₂ в свободном состоянии и в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA_{5/4} на выживаемость незаражённых клеток MDCK (рис. 2). Не связанная с НЧ siRNA_{5/4}, как и следовало ожидать, оказалась нетоксичной в исследуемом диапазоне концентраций. Цитотоксичность наноконплекса Si~NH₂/siRNA_{5/4} совпадает с токсичностью НЧ Si~NH₂. Следовательно, можно сделать вывод о том, что цитотоксичность наноконплексов определяется токсичностью входящих в них НЧ. Цитотоксическая концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое, определённая из данных рис. 2, составила 38 мМ в расчёте на Si~NH₂ и 38 мкМ в расчёте на siRNA.

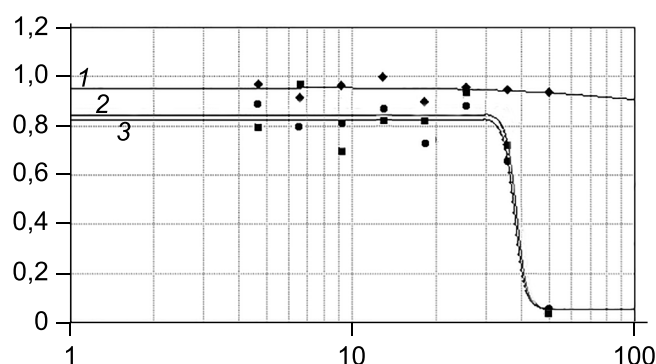


Рис. 2. Жизнеспособность клеток MDCK при обработке образцами siRNA и Si~NH₂ в свободном состоянии и в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA.

1 — siRNA_{5/4}; 2 — Si~NH₂; 3 — Si~NH₂/siRNA_{5/4}. На оси абсцисс приведена концентрация siRNA в свободном состоянии или в составе наноконплекса (мкМ) и наночастиц Si~NH₂ в свободном состоянии или в составе наноконплекса (мМ). На оси ординат приведена оптическая плотность раствора МТТ.

Fig. 2. Viability of MDCK cells when treated with siRNA and Si~NH₂ samples in the free state and as part of the Si~NH₂/siRNA nanocomplex.

1, siRNA_{5/4}; 2, Si~NH₂; 3, Si~NH₂/siRNA_{5/4}. The x-axis shows the concentration of siRNA in the free state or as part of a nanocomplex (μM) and Si~NH₂ nanoparticles in the free state or as part of a nanocomplex (mM). The y-axis shows optical density of the MTT solution.

Таблица 2. Зависимость противовирусной активности наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} от концентрации siRNA при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл**Table 2.** Dependence of antiviral activity of Si-NH₂/siRNA_{5/4} nanocomplex on siRNA concentration with MOI 0.01 TCID₅₀/cell

Концентрация siRNA _{5/4} в наноконплексе, мкМ Concentration of siRNA _{5/4} in nanocomplex, μM	Инфекционный титр вируса гриппа IgТЦД ₅₀ /мл Infection titer of influenza A virus IgTCID ₅₀ /mL	Подавление продукции вируса гриппа, % Inhibition of influenza A virus replication, %
1,00	4,50	99,99
0,50	5,75	99,82
0,10	7,00	97
0,05	7,50	90
0,01	7,50	90
Контроль вируса Virus control	8,50	–

В таблице 2 приведены результаты подавления продукции вируса гриппа в зависимости от концентрации наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} в среде культивирования клеток с вирусом гриппа.

Показано, что в диапазоне концентраций siRNA_{5/4} в наноконплексе Si-NH₂/siRNA_{5/4} от 0,01 до 1,00 мкМ подавление продукции вируса гриппа составляло 90,00–99,99%.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что НЧ АПС могут быть использованы для доставки siRNA в клетки в составе наноконплексов Si-NH₂/siRNA. Цитотоксичность наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} определяется токсичностью НЧ Si-NH₂. Цитотоксическая концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое, для наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} составила 38 мМ в расчёте на Si-NH₂ и 38 мкМ в расчёте на siRNA. Наноконплекс Si-NH₂/siRNA_{9/10}, содержащий неспецифическую для вируса гриппа A siRNA_{9/10}, был полностью неактивен. Это свидетельствует о селективности действия наноконплексов Si-NH₂/siRNA, несущих siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4} и siRNA_{7/4}, специфических к mRNA вируса гриппа. Таким образом, показано успешное использование предложенных наноконплексов, содержащих siRNA, нацеленных на выбранный участок 5-го сегмента мРНК вирусного генома, для подавления продукции вируса A/H5N1 в клеточной системе. Наиболее эффективный наноконплекс Si-NH₂/siRNA_{5/4} снижал репликацию вируса гриппа A в культуре клеток почти на 3 порядка.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Belgrad J., Fakhri H.H., Khvorova A. Nucleic acid therapeutics: successes, milestones, and upcoming innovation. *Nucl. Acid Ther.* 2024;34(2):52–72. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2023.0068>
- Singh L., Kruger H.G., Maguire G.E.M., et al. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 2017;4(4):105–31. DOI: <https://doi.org/10.1177/2049936117713593>
- Springer A.D., Dowdy S.F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucl. Acid Ther.* 2018;28(3):109–19. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- Adesina S.K., Akala E.O. Nanotechnology approaches for the delivery of exogenous siRNA for HIV therapy. *Mol. Pharm.* 2015;12(12):4175–87. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00335>
- Anwar S., Mir F., Yokota T. Enhancing the effectiveness of oligonucleotide therapeutics using cell-penetrating peptide conjugation, chemical modification, and carrier-based delivery strategies. *Pharmaceutics* 2023;15(4):1130. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130>
- Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med.* 2017;9(1):60. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0450-0>
- Uchida S., Perche F., Pichon C., Cabral H. Nanomedicine-based approaches for mRNA delivery. *Mol. Pharm.* 2020;17(10):3654–84. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618>
- Hajj K.A., Whitehead K.A. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater* 2017;2(10):1–17. DOI: <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>
- Sato Y., Okabe N., Note Y., et al. Hydrophobic scaffolds of pH-sensitive cationic lipids contribute to miscibility with phospholipids and improve the efficiency of delivering short interfering RNA by small-sized lipid nanoparticles. *Acta Biomater.* 2020;102(15):341–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.022>
- Cox A., Lim S.A., Chung E.J. Strategies to deliver RNA by nanoparticles for therapeutic potential. *Mol. Aspect. Med.* 2022;83:100991. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100991>
- Levina A.S., Repkova M.N., Netesova N.A., et al. Substantial antiviral potential of deoxyribozymes fixed on anatase nanoparticles against influenza A viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharm. Sci.* 2024;113(5):1202–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.10.028>
- Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., et al. Effective inhibition of newly emerged A/H7N9 virus with oligonucleotides targeted to conserved regions of the virus genome. *Nucleic Acid Ther.* 2021;31(6):436–42. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0061>
- Levina A., Repkova M., Shikina N., et al. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;162:92–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.006>

14. Levina A., Repkova M., Kupryushkin M., et al. In vivo hypotensive effect of aminosilanol-based nanocomposites bearing antisense oligonucleotides. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022;75:103612.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103612>
15. Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V., et al. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018;9:2516–25.
DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.234>
16. Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Филиппова Е.И. и др. Олигорибонуклеотид-содержащие нанокомплексы на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология.* 2023;78(4):267–72.
Repkova M.N., Mazurkov O.YU., Filippova E.I., et al. Oligoribonucleotide-containing nanocomplexes based on aminopropylsilanol nanoparticles as effective inhibitors of influenza A virus replication. *Herald of Moscow University. Series 16: Biology.* 2023;78(4):267–72.
DOI: <https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-8>
EDN: <https://elibrary.ru/bqvsft>
17. Liu Y., Lou C., Yang H., et al. Silica nanoparticles as promising drug/ gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2011;11(2):156–63.
DOI: <https://doi.org/10.2174/156800911794328411>
18. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 2002;83(Pt. 4):723–34.
DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-723>
19. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;100(5):2718–23.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
20. Khantasup K., Kopermsub P., Chaichoun K., Dharakul T. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic Avian Influenza A (H5N1) virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(5):2816–24.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02768-13>
21. Stoppani E., Bassi I., Dotti S., et al. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits *in vitro* replication of different influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral. Res.* 2015;120:16–22.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.017>
22. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides.* 2009;19(2):191–202.
DOI: <https://doi.org/10.1089/oli.2008.0162>
23. Petrova Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., et al. 2'-O-methyl-modified anti-MDR1 fork-siRNA duplexes exhibiting high nuclease resistance and prolonged silencing activity. *Oligonucleotides.* 2010;20(6):297–308.
DOI: <https://doi.org/10.1089/oli.2010.0246>
24. Anwar S., Mir F., Yokota T. Enhancing the effectiveness of oligonucleotide therapeutics using cell-penetrating peptide conjugation, chemical modification, and carrier-based delivery strategies. *Pharmaceutics.* 2023;15(4):1130.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130>
25. Crooke S.T., Baker B.F., Crooke R.M., Liang X.H. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021;20(6):427–53.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00162-z>
26. Fàbrega C., Aviñó A., Navarro N., et al. Lipid and peptide-oligonucleotide conjugates for therapeutic purposes: from simple hybrids to complex multifunctional assemblies. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):320.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020320>
27. Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(6):421–46.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0023-6>
28. Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic. *Front. Pharmacol.* 2019;11:444.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
29. Anguela X.M., High K.A. Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* 2019;70:273–88.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>

Информация об авторах

Репкова Марина Николаевна — к. х. н., н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Левина Ася Сауловна — к. х. н., с. н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Макаревич Елена Викторовна — н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Филиппова Екатерина Игоревна — к. б. н., н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Мазуркова Наталья Алексеевна — д. б. н., в. н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Зарытова Валентина Филипповна[✉] — д. х. н., г. н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Участие авторов: Репкова М.Н. — синтез наночастиц и нанокомплексов; Левина А.С. — написание статьи; Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И. — проведение экспериментов по оценке противовирусной активности и токсичности наноком-

Information about the authors

Marina N. Repkova — Cand. Sci. (Chem.), researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Asya S. Levina — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Oleg Yu. Mazurkov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Elena V. Makarevich — researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Ekaterina I. Filippova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Natalya A. Mazurkova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Valentina F. Zarytova[✉] — D. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamen-

плексов; *Мазуркова Н.А.* — анализ данных; *Зарытова В.Ф.* — концепция исследования, научное редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.08.2024;
принята к публикации 25.10.2024;
опубликована 30.12.2024

tal Medicine, Novosibirsk, Russia,
zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Author contribution: *Repkova M.N.* — synthesis of nanoparticles and nanocomplexes; *Levina A.S.* — writing an article; *Mazurkov O. Yu.*, *Makarevich E.V.*, *Filippova E.I.* — experiments to assess the antiviral activity and toxicity of nanocomplexes; *Mazurkova N.A.* — data analysis; *Zarytova V.F.* — research concept, editing the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 15.08.2024;
accepted for publication 25.10.2024;
published 30.12.2024



Анализ временных рядов заболеваемости денге в городе Бандунг, Индонезия, с использованием модели ARIMA

Agung Sutriyawan^{1,2✉}, Martini Martini¹, Dwi Sutiningsih¹, Farid Agushybana¹, Nur Endah Wahyuningsih¹, Victor Eneojo Adamu³, Hairil Akbar⁴, Matheus Aba⁵

¹Университет Дипонегоро, Семаранг, Индонезия;

²Университет Бхакти Кенкана, Бандунг, Индонезия;

³Университет Эвклида, Банги, Центральноафриканская Республика;

⁴Институт здравоохранения и технологий Graha Medika, Котамобагу, Индонезия;

⁵Колледж медицинских наук Вираутама, Бандунг, Индонезия

Аннотация

Введение. Вирус денге является проблемой общественного здравоохранения, которая приводит к смерти. Это заболевание необходимо контролировать, чтобы уменьшить его воздействие на общество.

Цель исследования — спрогнозировать заболеваемость денге в городе Бандунг, используя данные с 2014 по 2023 г.

Метод. В данном исследовании изучалась заболеваемость денге в городе Бандунг с 2014 по 2023 г., вторичные данные обрабатывали и анализировали с помощью модели авторегрессии скользящего среднего (ARIMA) для прогнозирования заболеваемости денге.

Результаты. Лучшей моделью является ARIMA (3,0,3), средняя абсолютная ошибка в процентах (MAPE = 33,3437) и информационный критерий Акаике (AIC = 0,1489). Исходя из модели, пик заболеваемости денге приходится на сентябрь 2024 г. (320 случаев).

Выводы. Пик заболеваемости денге в городе Бандунг придётся на сентябрь 2024 г. Отсюда следует, что необходимо проводить мероприятия по борьбе с переносчиками инфекции в нескольких подрайонах и наращивать усилия по профилактике и борьбе с денге.

Ключевые слова: *заболеваемость денге, прогноз заболеваемости денге, модель ARIMA, прогноз вспышек, Индонезия*

Благодарность. Автор благодарит Управление здравоохранения города Бандунг и Агентство статистического центра города Бандунг за помощь в проведении исследования. Авторы также хотели бы поблагодарить кафедру эпидемиологии Университета Дипонегоро за помощь в проведении данного исследования.

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: Sutriyawan A., Martini M., Sutiningsih D., Agushybana F., Wahyuningsih N.E., Adamu V.E., Akbar H., Aba M. Анализ временных рядов заболеваемости денге в городе Бандунг, Индонезия, с использованием модели ARIMA. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):803–811.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-570>

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

Original Study Article

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-570>

Time series analysis of dengue incidence in Bandung City, Indonesia using a ARIMA model

Agung Sutriyawan^{1,2✉}, Martini Martini¹, Dwi Sutiningsih¹, Farid Agushybana¹, Nur Endah Wahyuningsih¹, Victor Eneojo Adamu³, Hairil Akbar⁴, Matheus Aba⁵

¹Diponegoro University, Semarang, Indonesia;

²Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;

³Euclid University, Bangui, Central African Republic;

⁴Graha Medika Institute of Health and Technology, Kotamobagu, Indonesia;

⁵Wirautama College of Health Sciences, Bandung, Indonesia

Abstract

Background. Dengue is a public health problem that leads to death. This disease is necessary to monitor to reduce its impact on the community.

Purpose. This study aims to forecast the incidence of dengue in Bandung City using historical data from 2014 to 2023.

Method. This retrospective observational study examined dengue incidence in Bandung City from 2014 to 2023, secondary data were processed and analysed using Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA) model to forecast dengue incidence.

Results. The best model generated is ARIMA (3,0,3), Mean Absolute Percentage Error (MAPE = 33,3437) and Akaike Information Criterion (AIC = 0,1489). Based on the model, the peak of dengue cases is estimated to occur in September 2024 (320 cases).

Conclusion. The peak incidence of dengue in Bandung City will occur in September 2024. Hence the need for vector control efforts in several sub-districts and increasing efforts to prevent and control dengue.

Keywords: *Dengue incidence, Dengue forecast, ARIMA model, outbreak prediction, Indonesia*

Acknowledgement. The researcher would like to thank the Bandung City Health Office and the Bandung City Statistic Center Agency for assisting this research. We would also like to thank the Department of Epidemiology, Diponegoro University for providing assistance in this research.

Funding source. This research was fully funded by the researcher.

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

For citation: Sutriyawan A., Martini M., Sutiningsih D., Agushybana F., Wahyuningsih N.E., Adamu V.E., Akbar H., Aba M. Time series analysis of dengue incidence in Bandung City, Indonesia using a ARIMA model. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):803–811.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-570>

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

Introduction

Dengue is a disease transmitted by the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, caused by the dengue virus. It is more common in tropical and subtropical climates¹. In 2013, approximately 3.6 billion people and 40% of the global population resided in areas at risk of dengue or endemic to the disease. It is estimated that 400 million individuals contracted the dengue virus annually, resulting in 100 million dengue cases and approximately 21,000 deaths². A total of more than 100 countries worldwide have been identified as being endemic to dengue. The Americas, South-east Asia and the Western Pacific are the most severely affected regions by this disease. Seventy percent of the disease burden is concentrated in Asia. South and Southeast Asia are the regions with the highest number of cases, with an estimated 1.3 billion people residing in dengue-endemic areas across 10 countries in South-east Asia. Among the 30 countries with the highest endemicity rate in the world, India, Indonesia, Myanmar, Sri Lanka and Thailand are included³. Indonesia is one of the countries contributing the most cases of dengue in the world, with the number of cases continuing to increase. In 2021, there were 73,518 cases, which in-

creased to 143,266 in 2022. In 2023, there were 114,720 cases, resulting in 894 deaths⁴. Bandung City is one of the regions in Indonesia that contributes the highest incidence of dengue. In 2021, the incidence of dengue in Bandung City was recorded at 3,743 cases, increasing to 5,205 cases in 2022 and resulting in 10 deaths⁵.

The early identification of dengue outbreaks has the potential to enhance vector control efforts and permit public health authorities to implement proactive measures to prevent the spread of the disease [1]. A multitude of mathematical models have been employed to predict dengue incidence. Time series models are the most prevalent, as evidenced by studies conducted in Thailand [2], Singapore [3], Brazil [4] and China [5]. This model employs a combined approach between environmental and biological factors in order to forecast the risk of transmission and the magnitude of potential outbreaks. Furthermore, this model can integrate the complex interactions between environmental and biological factors that affect dengue transmission [6]. The models presented in some of these studies indicate that time series analysis is an invaluable tool for enhancing our understanding of dengue transmission dynamics and for the design of effective preventive measures to control the disease.

Time series analysis is a valuable tool in public

¹ World Health Organization. Dengue and severe dengue 2022. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

² Centers for Disease Control and Prevention. Why is Dengue a Global Issue. URL: <https://www.cdc.gov/dengue/training/cme/ccm/page51440.html>

³ World Health Organization. Dengue in the South-East Asia. URL: <https://www.who.int/southeastasia/health-topics/dengue-and-severe-dengue>

⁴ Ministry of Health of the Republic of Indonesia. Latest information on dengue up to week 8 2024. URL: <https://p2pm.kemkes.go.id/publikasi/infografis/informasi-terkini-dbd-hingga-minggu-ke-8-2024>

⁵ Health Office of Bandung City. Health Profile of Bandung City in 2022. URL: <https://dinkes.bandung.go.id/download/profil-keschatan-2022>

health and infectious disease surveillance [7]. Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA) model is a time series modelling technique that has been widely used to predict and forecast data with seasonal patterns. The model has proven effective in modelling and forecasting dengue incidence, revealing temporal patterns, and predicting future trends. The ARIMA model is versatile and has many practical applications in dengue prevention and control. The model is capable of identifying temporal patterns, thereby guiding targeted vector control measures during high-risk periods. Furthermore, the ARIMA model assists in developing an early warning system for dengue outbreaks, thereby improving the efficiency and effectiveness of vector control campaigns. These analyses provide insights into dengue transmission patterns and the impact of environmental and social factors on disease incidence [6]. The application of ARIMA modelling has facilitated a deeper understanding of temporal patterns, thereby enabling more effective prevention and control of outbreaks. This approach has been successfully employed in Brazil, Mexico, Singapore, Sri Lanka and Thailand [8].

The incidence of dengue cases in Indonesia is rising year on year, yet the efforts made to combat the disease are not yet optimal. Furthermore, the current treatment approach has not been proven effective in overcoming dengue, with the focus being on mitigating complications and reducing the severity of symptoms instead [9]. Consequently, there is a pressing necessity to implement effective prevention strategies. The ARIMA model is frequently employed in case forecasting research and provides insight into dengue epidemiology. However, in this study, the author sought to offer novel insights specific to the distinctive dynamics of dengue transmission in Bandung City. These insights can assist policymakers in developing early vigilance efforts and implementing dengue epidemiological surveillance, particularly with regard to place and time. The objective of this study is to forecast the incidence of dengue in order to facilitate more efficient dengue prevention and control efforts.

Materials and methods

Study design

This retrospective observational study was conducted using historical data of dengue cases in Bandung City, Indonesia from 2014 to 2023.

Study area

The study area of this research is Bandung City which is the capital of West Java Province, Indonesia, and is the third largest city in Indonesia. located at 107°36' East, 6°55' LS, and covers an area of 167.3/km². In 2023 the population of Bandung City is 2,569,107 people with a population density of approximately 15,000 people per square kilometre. Bandung City was chosen as the research location because it is a den-

gue endemic area and recorded a significantly higher amount of dengue cases from 2014 to 2023 compared to other regions.

Data collection

This study used secondary data from the Bandung City Health Office. The Disease Prevention and Control Unit of Bandung City Health Office provided monthly data on dengue incidence in Bandung City from January 2014 to December 2023. The monthly dataset contains a total of 120 monthly observations. The author used dengue cases covering 2014–2023 due to the availability of the dataset recorded from Bandung City Health Office. Dengue incidence data is something that must be reported in Bandung City routinely. The data available at the Bandung City Health Office are transferred data from community health center, hospitals and clinics, so this data is sufficient to describe the actual incidence.

Data management and statistical analysis

The forecasting data analysis method used R Studio software. The temporal pattern of dengue incidence in Bandung City was analysed using Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA), a statistical modelling approach that has been widely used for time series analysis. This approach was popularised by Box and Jenkins. During the study period, monthly dengue incidence cases were used to create an ARIMA time series analysis. In general, when dealing with data that does not show seasonal patterns, the model used is ARIMA (p, d, q). The parameters of the ARIMA model are as follows: p is the autoregressive (AR) number, which determines how many time periods are used to predict the current period. This parameter is determined from the partial autocorrelation function (PACF) diagram, d: the number of differentials taken for the static average and the parameter q represents the moving average (MA) number, which takes into account the deviation of the data series from the average of the series over a number of time periods to predict the current time period. These parameters are determined from the autocorrelation function (ACF) diagram. The evaluation of time series models includes the use of Akaike Information Criteria (AIC). Lower normalised AIC values are considered to be more favourable. Once the optimal model had been identified, the author proceeded to perform forecasting for 2024.

Ethical clearance

Ethical clearance and permission for this study was obtained from the Health Research Ethics Committee of Bhakti Kencana University with No. 079/09. KEPK/UBK/VII/2023.

Results

Figure 1 shows the map of Bandung City Area along with dengue incidence maps from 2014 to 2023.

These maps highlight the dengue incidence based on 30 sub-districts. The highest cases occurred in 2022 at 5,205 cases. The highest number of cases is in Bojôngloa Kidul Sub-district (299 cases), and the lowest number of cases is in Bandung Wetan Sub-district (65 cases). Meanwhile, the lowest number of cases occurred in 2017 at 1,786 cases. The highest number of cases was in Buah batu sub-district (134 cases) and the lowest number was in Cicadap sub-district (12 cases).

This study uses a dataset consisting of monthly dengue events in Bandung City from January 2014 to December 2023, which shows a random or non-seasonal pattern. The observed monthly dengue case series showed a stationary pattern as shown in **Figure 2, a**. To assess the stationarity of the data, the Dickey-Fuller test was performed and showed the data was stationary ($p = 0.01$). In the ACF plot, the value drops exponentially as it approaches 0 in **Fig. 2, b**. While the PACF that exceeds the maximum limit is at Lag 0, 1 and 3, then the appropriate model is AR = 3 seen in **Fig. 2, c**.

After identifying the model, we estimated the ARIMA model to determine the significant model. **Table 1** shows that the ARIMA models with significant coefficient estimates are ARIMA (3,0,1), ARIMA (3,0,2) and ARIMA (3,0,3).

The ARIMA models with significant coefficient estimates are ARIMA (3,0,1), ARIMA (3,0,2), and ARIMA (3,0,3). Diagnostic checking is done to ensure the best ARIMA model. The ACF plot of residuals does not exceed the boundary line for lag > 0, and the Ljung-box test shows that all values are above the boundary line, so the ARIMA (3,0,1) model is appropriate, otherwise there is no autocorrelation (**Fig. 3, a**). ACF plot of residuals exceeds the boundary line for lags > 0. The Ljung-box test shows that all values are above the boundary line, so the ARIMA (3,0,2) model is appropriate, otherwise there is no autocorrelation (**Fig. 3, b**). ACF plot of residuals exceeding the boundary line for lags > 0. The Ljung-box test shows that all values are above the boundary line, so the ARIMA (3,0,3) model is appropriate, otherwise there is no autocorrelation (**Fig. 3, c**).

The ARIMA (3,0,1), ARIMA (3,0,2) and ARIMA (3,0,3) models are all good, so to determine the best ARIMA model, the Mean Absolute Percentage Error (MAPE), and Akaike information criterion (AIC) values are used. **Table 2** shows the values of Mean Absolute Error (MAE), Root Mean Squared Error (RMSE), and Mean Absolute Percentage Error (MAPE), and Akaike information criterion (AIC). The most suitable model

Table 1. Estimation of ARIMA Model

Model	AR p-value	MA p-value
ARIMA (0,0,1)	–	Significant
ARIMA (0,0,2)	–	Significant
ARIMA (0,0,3)	–	Significant
ARIMA (1,0,0)	Significant	–
ARIMA (1,0,1)	Significant	Not significant
ARIMA (1,0,2)	Significant	Not significant
ARIMA (1,0,3)	Significant	Not significant
ARIMA (2,0,0)	Significant	–
ARIMA (2,0,1)	Significant	Not significant
ARIMA (2,0,2)	Not significant	Not significant
ARIMA (3,0,0)	Significant	Not significant
ARIMA (3,0,1)	Significant	Significant
ARIMA (3,0,2)	Significant	Significant
ARIMA (3,0,3)	Significant	Significant

forecast result is the ARIMA (3,0,3) model, which can be seen from the MAPE value of 33.3437 and the AIC value of 0.1489.

ARIMA model (3,0,3) to forecast dengue incidence from January 2024 to December 2024, with a MAPE value of 33.3437 or 3.33%. The observed and forecasted values of dengue incidence for 2024 are presented in **Fig. 4**. The trend of dengue cases in Bandung City from January to December 2024 tends to increase.

The results of the forecast of dengue incidence in Bandung City in 2024 (**Table 3**), we found that the highest number of cases occurred in September 2024 which was 320 and the lowest in January 2024 which was 217 cases. This finding is quite similar to the pattern of dengue incidence in observational data, so this model is sufficient to describe the forecast of dengue incidence in 2024.

Discussion

The incidence of dengue in Bandung City has consistently posed a significant public health concern in recent years. The city's dengue incidence rate is notably higher than that of other cities and districts, with a high mortality rate. Dengue incidence is typically highest during the rainy season [10], with population density also playing a role [11]. The Indonesian government has implemented dengue prevention and control efforts, including the eradication of mosquito nests [12].

Table 2. Mean Absolute Percentage Error (MAPE), and Akaike information criterion (AIC) on ARIMA Model

Model	RSME	MAE	MAPE	AIC
ARIMA (3,0,1)	114.0923	75.344	34.08223	0,1492
ARIMA (3,0,2)	111.3093	74.16202	33.87018	0,1490
ARIMA (3,0,3)	110.0493	73.42905	33.3437	0,1489

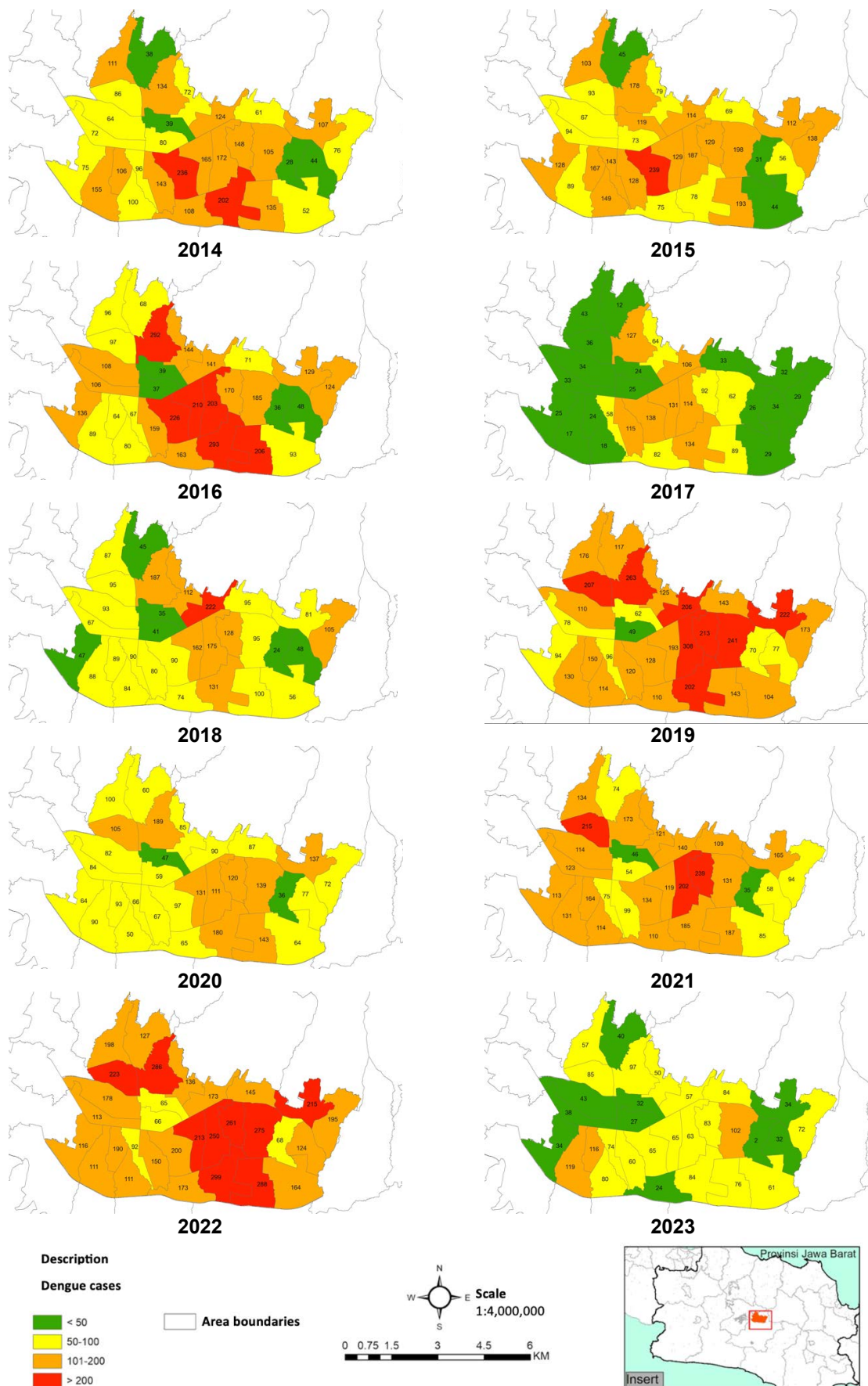


Fig. 1. Dengue incidence in Bandung City in 2014–2023.

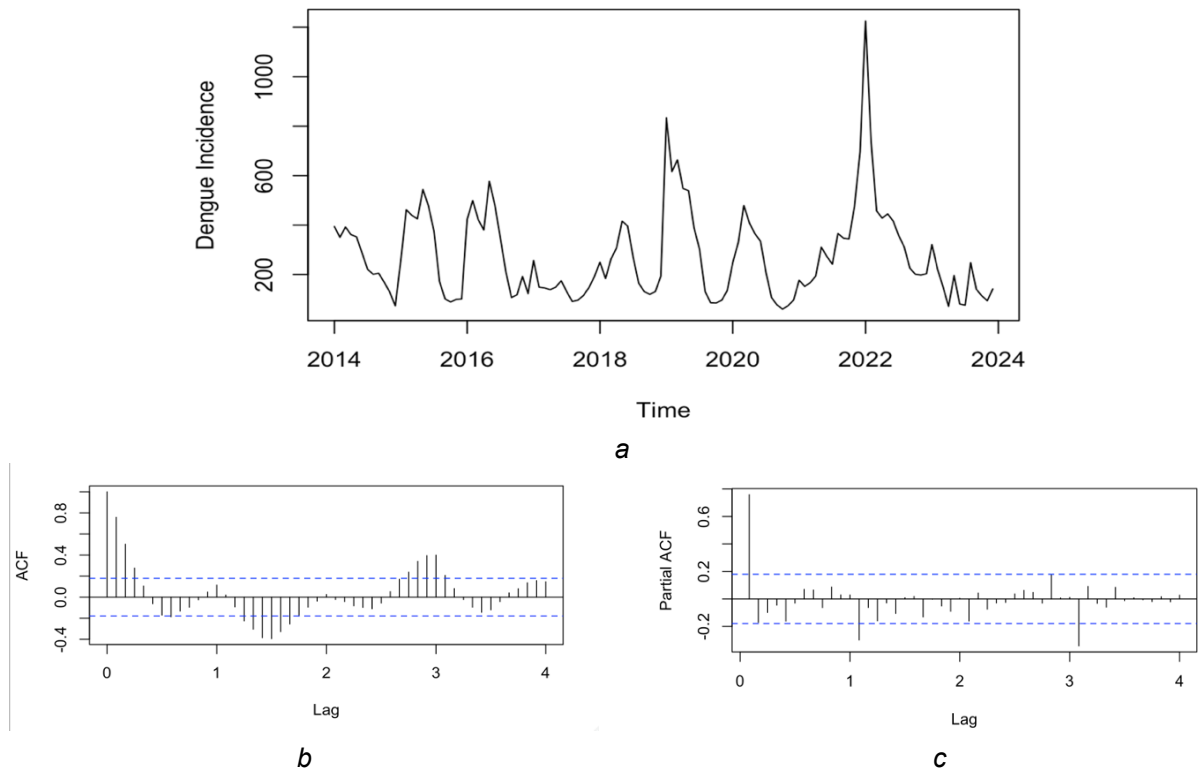


Fig. 2. Dengue incidence based on January 2014 to December 2023 in Bandung City (a), autocorrelation function (b), partial autocorrelation function (c).

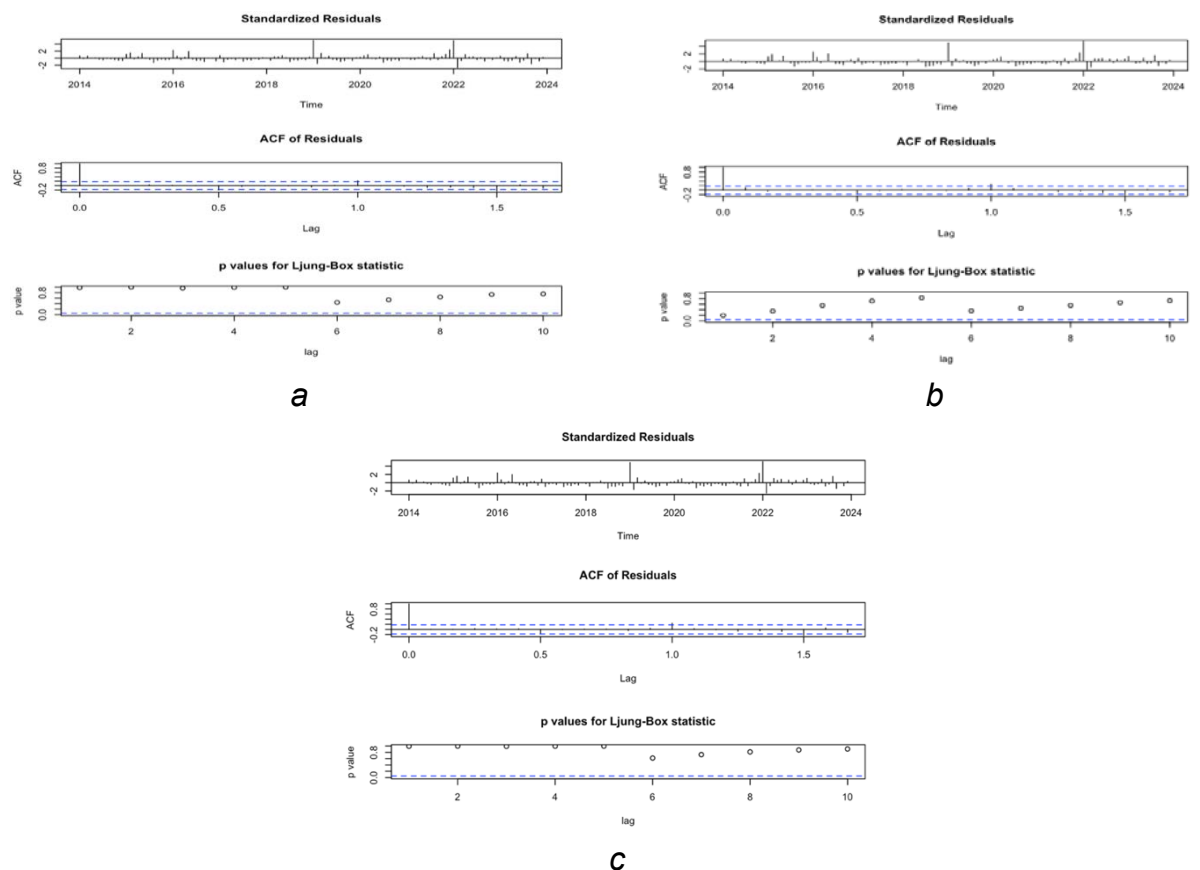


Fig. 3. Diagnostic checking of ARIMA Model (3,0,1) (a), ARIMA Model (3,0,2) (b), RIMA Model (3,0,3) (c).

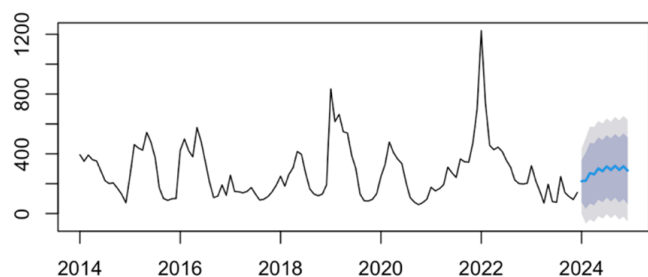


Fig. 4. Observed and predicted dengue incidence from ARIMA model (3,0,3) in 2024 in Bandung City.

Table 3. Prediction of dengue fever cases in Bandung City in 2024 obtained from the ARIMA model (3,0,3)

Month	Cases
Jan-24	217
Feb-24	221
Mar-24	272
Apr-24	263
May-24	303
Jun-24	285
Jul-24	316
Aug-24	293
Sep-24	320
Oct-24	293
Nov-24	318
Dec-24	289

Case experience, such as the ARIMA technique, plays an important role in the conduct of dengue prevention and control planning. This study employed the ARIMA technique to forecast dengue incidence in Bandung City. The findings of this study can serve as a source of information for the government and researchers in preparing and responding to dengue outbreaks in Indonesia.

This study utilises monthly dengue incidence data from January 2014 to December 2023. The SARIMA model was employed to forecast the number of dengue events in 2024. The accuracy of the SARIMA model is contingent upon the quality and availability of data, as well as the selection of appropriate model parameters and assumptions. In this study, the observation data is stationary. This study demonstrates that large data sets facilitate the generation of more accurate models and forecasts. The best model for forecasting Bandung City cases is the ARIMA model (3,0,3), which provides the most accurate forecast of dengue incidence. ARIMA models have been widely used in Southeast Asia, especially in Malaysia, Vietnam, Myanmar and Thailand. Some of these countries have used the ARIMA model to forecast dengue incidence effectively [13–16]. Another study in Indonesia posited that the ARIMA model can assist in the prediction of dengue cases and can be utilized by the government to design effective public

health measures to prevent and control dengue incidence, particularly at the outset of an outbreak [17]. A study conducted in Indonesia found that the SARIMA model accurately predicts monthly dengue cases, thereby supporting the development of an early warning system for dengue outbreaks [18].

The findings in Sri Lanka indicate that the ARIMA model has demonstrated its capacity in effectively forecasting weekly dengue cases. This makes it a viable proposition for forecasting weekly dengue incidence in the short term. The model can be utilised to improve the Ministry of Health's preparedness and response strategies, ultimately contributing to the proactive management of dengue outbreaks [19]. In Bandung City and Indonesia, the dengue incidence forecasting model can help in improving the existing strategies in preventing and controlling dengue disease. Furthermore, the prediction of cases can facilitate the response to outbreaks that do occur, given that Bandung City is an endemic area and that frequent outbreaks are a regular occurrence. Therefore, forecasting models are required.

The findings of this study have significant implications for dengue prevention policies and practices in Bandung City. The use of the ARIMA (3,0,3) forecasting model can provide important information about the appropriate strategies in preventing and controlling dengue incidence, including mosquito nest eradication measures and vector control. It is predicted that dengue incidence will increase in September 2024, which coincides with the beginning of the rainy season. This finding is consistent with research in Nepal which states a seasonal pattern of dengue incidence, with the development of cases in September, reaching the highest point in September-October. Dengue cases peak in months with the highest temperature and rainfall [20]. The spatial map of dengue incidence in Bandung City from 2014 to 2023 is quite varied, with several sub-districts exhibiting a high number of cases each year. Sub-districts with a high number of cases are areas with a high population density. Findings in Sri Lanka and Brazil have indicated that the spread of dengue vectors is due to demographic factors such as population density [21, 22]. Other studies have identified higher dengue incidence rates in certain areas due to climatic variations, socioeconomic status, urbanisation, and vector control efforts [23, 24].

The predictive accuracy of this model can be enhanced by incorporating the potential impact of climatic variables, such as temperature, humidity, precipitation and wind speed, on dengue transmission [25, 26]. These climatic factors are known to play a significant role in dengue transmission [27], and therefore, it is essential to include them in future research to enhance the predictive capacity of the model and facilitate a deeper understanding of disease mechanisms and the development of effective public health interventions. Bandung City is situated at an average altitude of 700 metres

above sea level, which is conducive to the proliferation of *Aedes aegypti* mosquitoes. Research conducted in Colombia indicates that the *Aedes aegypti* mosquito is more prevalent at altitudes below 1,000 metres [28]. Furthermore, the seasonal increase in dengue incidence in Bandung City is attributed to the density of mosquito larvae. Previous findings have indicated that the entomological index, which is defined as the density of mosquito larvae, plays a significant role in the increase of dengue incidence in Bandung City [29].

Given the limitations of this study, including the potential influence of climatic factors, population density, altitude and high population mobility, it is crucial to develop a model to describe dengue case patterns in future studies. Overall, this study has significant implications for the public health of Bandung City and Indonesia. It is imperative to implement prevention efforts at the beginning of the peak cases to avoid the occurrence of dengue outbreaks.

Conclusion

This study presents a ARIMA model for forecasting dengue incidence in Bandung City, Indonesia. Monthly confirmed dengue events in Bandung City were obtained from 2014 to 2023 for this study, with the objective of forecasting dengue disease outbreaks in the early phase and enabling rapid response. The ARIMA model (3,0,3) proved to be the most accurate in forecasting future dengue incidence. The model predicts the peak of dengue cases in September 2024 with an estimated 320 cases. This model will be useful for dengue epidemiological surveillance and for policy makers in improving dengue prevention and control efforts. The spatial map shows that certain sub-districts had very high dengue incidence from 2014 to 2023, which emphasises the necessity for targeted intervention in high-risk areas for vector control. The incorporation of climatic variables, in conjunction with other factors such as population density, altitude and population mobility, is essential for the generation of more precise disease incidence forecasts. Consequently, these variables should be incorporated into the development of models designed to describe future dengue incidence patterns.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Al-Worafi Y.M. Infectious disease causes and risk factors in developing countries: pediatrics. In: *Handbook of Medical and Health Sciences in Developing Countries*. Cham: Springer; 2024:1–18.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-74786-2_327-1
- Polwiang S. The time series seasonal patterns of dengue fever and associated weather variables in Bangkok (2003–2017). *BMC Infect. Dis.* 2020;20(1):208.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4902-6>
- Seah A., Aik J., Ng L.C., Tam C.C. The effects of maximum ambient temperature and heatwaves on dengue infections in the tropical city-state of Singapore – a time series analysis. *Sci. Total Environ.* 2021;775:145117.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145117>
- Stolerman L.M., Maia P.D., Kutz J.N. Forecasting dengue fever in Brazil: An assessment of climate conditions. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220106.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220106>
- Liu D., Guo S., Zou M., et al. A dengue fever predicting model based on Baidu search index data and climate data in South China. *PLoS One.* 2019;14(12):e0226841.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226841>
- Aung S.H., Kyaw A.M.M., Phuanukoonnon S., Jittamala P., Soonthornworasiri N. A SARIMA time series forecasting for dengue cases for reporting to Yangon Region, Myanmar. *J. Public Health Dev.* 2024;22(1):184–96.
DOI: <https://doi.org/10.55131/jphd/2024/220114>
- Talaei-Khoei A., Wilson J.M., Kazemi S.F. Period of measurement in time-series predictions of disease counts from 2007 to 2017 in Northern Nevada: analytics experiment. *JMIR Public Health Surveill.* 2019;5(1):e11357.
DOI: <https://doi.org/10.2196/11357>
- Riley P., Ben-Nun M., Turtle J., et al. SARIMA forecasts of dengue incidence in Brazil, Mexico, Singapore, Sri Lanka, and Thailand: model performance and the significance of reporting delays. *medRxiv*. Preprint.
DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.06.26.20141093>
- Harapan H., Michie A., Sasmono R.T., Imrie A. Dengue: a mini-review. *Viruses.* 2020;12(8):829.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- Kumharn W., Piwngam W., Pilahome O., et al. Effects of meteorological factors on dengue incidence in Bangkok city: a model for dengue prediction. *Model Earth Syst. Environ.* 2023; 9(1):1215–22.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s40808-022-01557-6>
- Man O., Kraay A., Thomas R., et al. Characterizing dengue transmission in rural areas: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2023;17(6):e0011333.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011333>
- Rakhmani A.N., Zuhriyah L. Knowledge, attitudes, and practices regarding dengue prevention among health volunteers in an urban area – Malang, Indonesia. *J Prev Med Public Health.* 2024;57(2):176–84. DOI: <https://doi.org/10.3961/jpmph.23.484>
- Thiruchelvam L., Dass S.C., Asirvadani V.S., et al. Determine neighboring region spatial effect on dengue cases using ensemble ARIMA models. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5873.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84176-y>
- Pham N.T., Nguyen C.T., Pineda-Cortel M.R.B. Time-series modelling of dengue incidence in the Mekong Delta region of Viet Nam using remote sensing data. *Western Pac. Surveill. Response J.* 2020;11(1):13–21.
DOI: <https://doi.org/10.5365/wpsar.2018.9.2.012>
- Zaw W., Lin Z., Ko Ko J., et al. Dengue in Myanmar: Spatio-temporal epidemiology, association with climate and short-term prediction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2023;17(6):e0011331.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011331>
- Kiang M.V., Santillana M., Chen J.T., et al. Incorporating human mobility data improves forecasts of Dengue fever in Thailand. *Sci. Rep.* 2021;11(1):923.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79438-0>
- Othman M., Indawati R., Suleiman A.A., et al. Model forecasting development for dengue fever incidence in Surabaya city using time series analysis. *Processes.* 2022;10(11): 2454.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pr10112454>
- Khaira U., Utomo P.E.P., Aryani R., Weni I. A comparison of SARIMA and LSTM in forecasting dengue hemorrhagic fever incidence in Jambi, Indonesia. *J. Phys. Conf. Ser.* 2020;1566(1): 012054. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1566/1/012054>

19. Karasinghe N., Peiris S., Jayathilaka R., Dharmasena T. Forecasting weekly dengue incidence in Sri Lanka: Modified autoregressive integrated moving average modeling approach. *PLoS One*. 2024;19(3):e0299953.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299953>
20. Tuladhar R., Singh A., Varma A., Choudhary D.K. Climatic factors influencing dengue incidence in an epidemic area of Nepal. *BMC Res. Notes*. 2019;12(1):131.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4185-4>
21. Faruk M.O., Jannat S.N., Rahman M.S. Impact of environmental factors on the spread of dengue fever in Sri Lanka. *Int. J. Environ. Sci. Technol. (Tehran)*. 2022;19(11):10637–48.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03905-y>
22. Romeo-Aznar V., Picinini Freitas L., Gonçalves Cruz O., et al. Fine-scale heterogeneity in population density predicts wave dynamics in dengue epidemics. *Nat. Commun*. 2022;13(1):996.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28231-w>
23. Zheng L., Ren H.Y., Shi R.H., Lu L. Spatiotemporal characteristics and primary influencing factors of typical dengue fever epidemics in China. *Infect. Dis. Poverty*. 2019;8(1):24.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0533-9>
24. Li C., Wu X., Wang X., et al. Ecological environment and socioeconomic factors drive long-term transmission and extreme outbreak of dengue fever in epidemic region of China. *J. Clean. Prod*. 2021;279:123870.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123870>
25. Ouattara C.A., Traore T.I., Traore S., et al. Climate factors and dengue fever in Burkina Faso from 2017 to 2019. *J. Public Health Afr*. 2022;13(1):2145.
DOI: <https://doi.org/10.4081/jphia.2022.2145>
26. Xavier L.L., Honório N.A., Pessanha J.F.M., Peiter P.C. Analysis of climate factors and dengue incidence in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251403.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251403>
27. Sutriyawan A., Kurniati N., Novianti N., et al. Analysis of temperature, humidity, rainfall, and wind velocity on dengue hemorrhagic fever in Bandung municipality. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2024;14(1):155–62.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-2110>
EDN: <https://elibrary.ru/cjazjb>
28. Ouattara C.A., Traore T.I., Traore S., et al. Climate factors and dengue fever in Burkina Faso from 2017 to 2019. *J. Public Health Afr*. 2022;13(1):2145.
DOI: <https://doi.org/10.4081/jphia.2022.2145>
29. Sutriyawan A., Manap A., Sulami N., et al. Analysis of entomological indicators and distribution of *Aedes aegypti* larvae in dengue endemic areas. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(4):314–20.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-406>
EDN: <https://elibrary.ru/rjnhz>

Информация об авторах

Agung Sutriyawan — исследователь, магистрант каф. эпидемиологии, аспирантуры Университета Дипонегоро; зав. каф. общественного здравоохранения факультета наук о здоровье Университета Бхакти Кенчана, Бандунг, Индонезия, agung.sutriawan@bku.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-6119-6073>

Martini Martini — с. н. с. каф. эпидемиологии факультета общественного здравоохранения Университета Дипонегоро, Семаранг, Индонезия, <https://orcid.org/0000-0002-6773-1727>

Dwi Sutiningsih — с. н. с. каф. общественного здравоохранения Университета Бхакти Кенчана, Бандунг, Индонезия, <https://orcid.org/0000-0002-4128-6688>

Farid Agushybana — с. н. с. каф. биостатистики и демографии факультета общественного здравоохранения Университета Дипонегоро, Семаранг, Индонезия, <https://orcid.org/0000-0002-8557-370X>

Nur Endah Wahyuningsih — с. н. с. каф. гигиены окружающей среды факультета общественного здравоохранения Университета Дипонегоро, Семаранг, Индонезия, <https://orcid.org/0000-0002-1358-1823>

Victor Eneojo Adamu — с. н. с. Школы глобального здоровья и биоэтики им. Энгельхарда, Межправительственный университет «Эвклид», Банги, Центральноафриканская Республика, <https://orcid.org/0000-0003-3352-0021>

Hairil Akbar — с. н. с., зав. каф. общественного здравоохранения Института здравоохранения и технологий Graha Medika, Котамобату, Индонезия, <https://orcid.org/0000-0002-6672-9174>

Matheus Aba — исследователь, каф. общественного здравоохранения Индонезийской высшей школы медицинских наук Wirautama, Бандунг, Индонезия, <https://orcid.org/0009-0009-1379-881X>

Information about the authors

Agung Sutriyawan — researcher, Master student, Department of epidemiology, Postgraduate school, Diponegoro University; Head, Department of public health, Faculty of health sciences, Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia, agung.sutriawan@bku.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-6119-6073>

Martini Martini — senior researcher, Department of epidemiology, Faculty of public health, Diponegoro University, Semarang, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-6773-1727>

Dwi Sutiningsih — senior researcher, Department of public health, Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-4128-6688>

Farid Agushybana — senior researcher, Department of biostatistics and population, Faculty of public health, Diponegoro University, Semarang, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-8557-370X>

Nur Endah Wahyuningsih — senior researcher, Department of environmental health, Faculty of public health, Diponegoro University, Semarang, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-1358-1823>

Victor Eneojo Adamu — senior researcher, Engelhardt school of global health & bioethics, Euclid University, Bangui, Central African Republic, <https://orcid.org/0000-0003-3352-0021>

Hairil Akbar — senior researcher, Head, Department of public health, Graha Medika Institute of Health and Technology, Kotamobagu, Indonesia, <https://orcid.org/0000-0002-6672-9174>

Matheus Aba — researcher, Department of public health, Wirautama College of Health Sciences, Bandung, Indonesia, <https://orcid.org/0009-0009-1379-881X>

The article was submitted 02.08.2024;
accepted for publication 04.08.2024;
published 30.12.2024

Статья поступила в редакцию 02.08.2024;
принята к публикации 04.08.2024;
опубликована 30.12.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-515>



Выявление *Streptococcus agalactiae* молекулярными методами у беременных женщин и частота вертикальной передачи новорождённым в провинции Вавилон

Ali D. Marhash[✉], Zainab N. Nabat, Nawras A. Abbas

Вавилонский технический институт, Технический университет Аль-Фурат Аль-Аусат, Вавилон, Ирак

Аннотация

Введение. *Streptococcus agalactiae* — грамположительные, неподвижные и инкапсулированные кокки. На кровяном агаре они образуют узкую зону бета-гемолиза. Этот возбудитель при передаче от инфицированных матерей вызывает инвазивные бактериальные заболевания у новорождённых, в том числе сепсис, менингит, септицемию и пневмонию. *Streptococcus agalactiae* является патогеном, вызывающим первоочередную озабоченность общественного здравоохранения.

Цель работы — провести объективное исследование по выделению и молекулярному выявлению гена вирулентности стрептококка группы В (СГВ) и оценить частоту передачи инфекции от матери новорождённому.

Материалы и методы. В проспективное когортное исследование вошли 300 беременных женщин со сроком беременности более 35 нед. У всех участниц исследования собирали вагинальные мазки, всех женщин с диагностированным СГВ обследовали после родов, чтобы взять мазки у их новорождённых. Для оценки выделенных бактерий использовали традиционные микробиологические и молекулярные подходы.

Результаты. В исследовании приняли участие 60 (20%) из 300 беременных женщин и 16 (26,6%) их новорождённых. СГВ был обнаружен с помощью культуральных методов и подтверждён с помощью ПЦР с праймерами для выявления гена *atr* (гена домашнего хозяйства). Положительные изоляты были на 100% чувствительны к антибиотикам, таким как цефтриаксон, пенициллин и ванкомицин, 93% были чувствительны к хлорамфениколу, 83% — к эритромицину, 13% — к тетрациклину.

Заключение. Наши данные показали высокую частоту инфицирования СГВ у беременных женщин и их новорождённых. Необходимо проводить обязательный скрининг и профилактическое лечение, чтобы свести к минимуму потенциально смертельные последствия этого заболевания.

Ключевые слова: стрептококки группы В, молекулярное обнаружение, колонизация беременных женщин, колонизация новорождённых, чувствительность к противомикробным препаратам

Этическое утверждение. Перед участием все беременные женщины добровольно подписывали форму информированного согласия. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Вавилонского технического института Технического университета Аль-Фурат Аль-Аусат (протокол № 8643/27/7 от 24.09.2023).

Благодарность. Авторы выражают благодарность пациентам, принимавшим участие в исследовании, медицинскому персоналу родильного дома Аль-Захраа в Вавилоне и лаборанту г-ну Хасану Сааду Аль-Амри за помощь в завершении этой работы.

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: Marhash A.D., Nabat Z.N., Abbas N.A. Молекулярное обнаружение *Streptococcus agalactiae* у беременных женщин и процент вертикальной передачи их новорождённым в провинции Вавилон. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):812–819.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-515>

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

Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women and percentage of vertical transmission to their neonates in Babylon province

Ali D. Marhash[✉], Zainab N. Nabat, Nawras A. Abbas

Babylon Technical Institute, Al Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq

Abstract

Introduction. *Streptococcus agalactiae* are gram-positive, non-motile and encapsulated cocci. On blood agar, they produce an narrow zone of beta-haemolysis. This pathogen causes invasive bacterial diseases in newborns, including sepsis, meningitis, septicaemia, and pneumonia, when transmitted from infected mothers. Since *S. agalactiae* is a pathogen of primary concern for public health, this research has been conducted on it.

The **objective** of the study is the isolation and molecular detection of virulence gene of *S. agalactiae* group B (GBS), and evaluation of the percentage of mother-to-child transmission of the pathogen.

Materials and methods. A prospective cohort study was designed that included 300 pregnant women who were at more than 35 weeks of pregnancy. The gynaecologist collected 300 vaginal swabs from all participants in this study and followed up on all GBS-positive pregnant women after delivery to take swabs from their neonates. Traditional microbiological and molecular approaches were used to study isolated bacteria.

Result. Sixty (20%) of three hundred pregnant women and 16 (26.6%) of their newborns were enrolled in this study. GBS was detected via culture methods and was confirmed by PCR with primers employed for the detection of *atr* gene (housekeeping gene). Positive isolates were 100% susceptible to antibiotics such as ceftriaxone, penicillin, and vancomycin, 93% were sensitive to chloramphenicol, 83% to erythromycin, and only 13% to tetracycline.

Conclusion. Our data showed a high frequency of GBS infection in pregnant women and their newborns. A mandatory screening test and preventative medicine should be adopted to minimize the potentially fatal repercussions of this sickness.

Keywords: *Streptococcus agalactiae* group B, molecular detection, pregnant women colonization, neonatal colonization antimicrobial susceptibility

Ethics approval. Prior to participation, all pregnant women signed a consent form detailing the study's objectives and their willingness to participate. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Babylon Technical Institute, Al Furat Al-Awsat Technical University (protocol No. 8643/27/7, September 24, 2023).

Acknowledgement. The authors would like to express their gratitude to the patients who took part in the study, the medical staff at Al-Zahraa Maternity Hospital in Babylon, and Mr. Hassan Saad Al-Amri, the laboratory technician.

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: Marhash A.D., Nabat Z.N., Abbas N.A. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women and percentage of vertical transmission to their neonates in Babylon province. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):812–819.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-515>

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

Introduction

Group B *Streptococcus agalactiae* (GBS) are normal inhabitants of the human gastrointestinal and genitourinary systems. They are the primary cause of serious bacterial infections like neonatal meningitis, symptoms-free bacteriuria, Urinary tract infections (UTIs), bladder infection, inflammation of kidneys and pelvis, intra-amniotic infection (IAI), postpartum endometritis and pre- and postpartum bacteraemia. It is a gram-positive, opportunistic, beta-haemolytic bacteria with possible complications. It also causes infections of surgical wounds in pregnant women [1, 2]. By maternal rec-tovaginal colonization, GBS causes a variety of prenatal and maternal illnesses, consisting of infections in the mother, stillbirths, premature births, as well as early and

late-onset sepsis in infants [3–6]. GBS-colonized mothers run the risk of vertical transmission of these bacteria to the newborn. It is one of the risk factors for early-onset sepsis in newborns [7]. This dynamic colonization constitutes the highest infectious disease risk for newborns. Notably, reports from international literature show that the rates of maternal GBS colonization were 6.5–36% in Europe [5, 6], 10–30% in North America [7, 8], 16.5–31.6% in African nations [9], and 1.4–36.7% in South America, which includes Brazil [10, 11], Chile¹, Peru [12], and Argentina [13].

¹ WHO. Number of infant deaths (between birth and 11 months); 2022. URL: <https://who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-infant-deaths>

The first recommendations for women's intrapartum antibiotic treatment to prevent GBS infection were established in 1966 [12]. Following the introduction of these treatments, the incidence of newborn GBS disease was reduced by 80% in America [14]. According to recommendations from the CDC (Centres for Disease Control and Prevention)², GBS can be diagnosed at 35–37 weeks of gestation using selective enrichment broth culture; however, this is not always possible in poor-income regions [5].

Maternal colonization with GBS is the greatest significant threat for newborn early-onset disease (EOD) (from 0 to 6 days) [15]. In 1973, a single infant was born to a GBS-infected woman from a group of 46 pregnant mothers, and EOD was first recorded. Among the neonates born to women with GBS infection, 2.17% were at risk for EOD at the time intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) has been suggested for both microbiological and risk-based screening in the United States [8]. According to the data from the World Health Organization (WHO), there were 1601 new-born fatalities in Sri Lanka in 2017, of which 0.04% were related to sepsis and other infectious diseases [11]. The convenient use of antibiotics and the detection of pathogens can further lower mortality rates in this population [15]. Consequently, monitoring maternal pathogen colonization is a crucial safeguard against infant infection. In 1980, the global prevalence of maternal GBS colonization was 18%, the Caribbean had a higher prevalence (34%), while Melanesia had the lowest (2%). Similar colonization rates (23%) were observed in North America, Europe, and Australia; Comparatively, the incidence was slightly higher in South Africa than in the Western nations, although it was lower in East Asia (9%), South and Southeast of Asia together was observed around (14%), West Africa (13%), and Central America (10%) [10]. The lack of publications in East Asia, South Asia, Southeast Asia, Western Africa and Central America may be the cause of the subpar prevalence estimates from these locations [10].

Polymerase chain reaction (PCR) assays provide an additional option for the quick identification of GBS colonization [11]. The **aim** of our study was the isolation of GBS strains and detection of the virulence gene by molecular method from pregnant mothers and their neonates, evaluation of the ratio of vertical transmission from infected women to their neonates, and reduction of the mortality and morbidity rates associated with GBS infection by using appropriate prophylactic antibiotics in Iraq, where neither screening for GBS nor an IAP protocol existed until the beginning of this study.

Materials and methods

Study Design

A prospective cohort study was designed that involved 300 pregnant women who were at 35 weeks or more of gestation. Three hundred vaginal swabs were taken before labor from all expectant mothers by the gynaecologist and 60 swabs from neonates born to GBS-positive women were taken shortly (to avoid contamination from other sources) after birth in the delivery room, including neonatal swabs from three sites (oral cavity, ear, and umbilicus). These neonates were born healthy.

Inclusion and Exclusion Criteria

Pregnant women who were in the final weeks of gestation (≥ 35 weeks) and were attending the Al-Zahraa Hospital of Obstetrics in Babylon (Iraq) were included in this study. This study excluded pregnant women who took antibiotics within 10 days of delivery and those who underwent caesarean surgery.

Bacteriological Identification of Isolates

All swab isolates from pregnant women and their neonates were screened for the period from November 2021 to June 2022. It was done by incubating specimens directly in the Todd-Hewitt Broth selective media overnight at 37°C and subsequently subculturing them on blood agar to select the proper colony. The colonies were inspected and identified using the following criteria: a narrow beta haemolysis zone, gram positive cocci, bacitracin resistance, catalase negativity, sodium hippurate hydrolysis positivity, and CAMP positivity, in order to determine whether or not the plates contained GBS organisms.

Molecular identification of isolates

Samples that were positive for GBS in the culture method were sent for molecular detection after DNA

Table 1. Primer sequence for *atr* genes [16]

Gene	Primer Sequence (5'–3')	Size, bp
<i>Atr</i>	F-5'CAACGATTCTCTCAGCTTTGTAA3' R-5'TAAGAAATCTCTTGTGCGGATTT3'	780

Table 2. PCR programme

Steps	Temperature, °C	Time, min	Cycles
Initial denaturation	94	1.00	1
Denaturation	94	1.00	
Annealing	55	0.75	30
Elongation	72	1.00	
Final extension	72	10.00	1
Hold	4	7.00	1

² Verani J.R., McGee L., Schrag S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC; 2010. URL: <https://cdc.gov/Mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>

extraction using the bacterial DNA extraction kit Geneaid (Taiwan). The primers and PCR steps used in the experiment to amplify *atr* housekeeping gene are listed in **Table 1** and **Table 2**. 1 µl of each upstream and downstream primer, 16 µl of nuclease-free water and 2 µl of extracted DNA were added to Master Mix to total volume of 25 µl in each reaction. Electrophoresis in a 2% agarose gel was used for detection of the PCR amplification product.

Antibiotic susceptibility test

The CLSI-recommended Kirby–Bauer disc diffusion technique with modifications on Muller Hinton agar and 5% blood was used to conduct the antibiotic sensitivity test [12]. In this method, antibiotics such as ciprofloxacin, ampicillin, penicillin, chloramphenicol, erythromycin, levofloxacin, vancomycin, tetracycline and levofloxacin were used.

Statistical Analysis

Student t-test was employed for quantitative variables and Chi-squared test was performed whenever available for binomial variables. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Table 3. GBS Isolates from Women and Their Newborns

Isolates	Frequency	Percentage	Total
Pregnant women	60	20.0	300
Newborns	16	26.6	60

Table 4. Age, residence and parity of patients

Variables	Culture result		Total	<i>p</i>	
	negative (<i>n</i> = 240)	positive (<i>n</i> = 60)			
Age (mean ± SD), years	28.44 ± 8.20	29.92 ± 8.60	28.60 ± 8.20	0.3	
Range	(15–44)	(15–41)	(15–44)		
Residence	Urban <i>n</i> (%)	92 (28.4)	13 (21.7)	105 (100.0)	0.015*
	Rural <i>n</i> (%)	148 (61.6)	47 (78.3)	195 (100.0)	
Parity	1 <i>n</i> (%)	26 (10.8)	7 (11.6)	33 (100.0)	0.2856
	2 <i>n</i> (%)	64 (26.6)	15 (25.0)	79 (100.0)	
	> 3 <i>n</i> (%)	150 (61.6)	38 (63.3)	188 (100.0)	

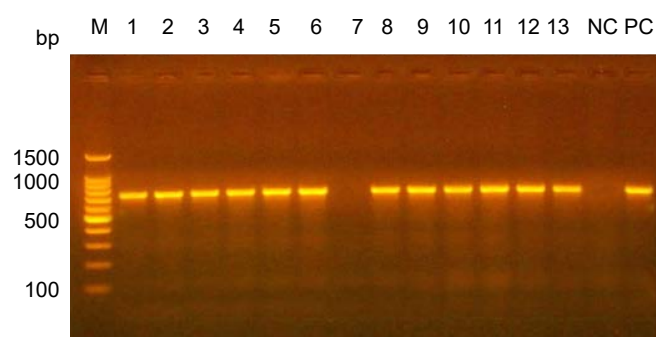
Note. *Represent a significant difference at *p* ≤ 0.05.

Table 5. Age groups of female participants

Age group, years	Culture		Total	<i>p</i>
	negative, <i>n</i> (%)	positive, <i>n</i> (%)		
15–24	68 (28.4)	15 (20.0)	83 (27.7)	0.784
25–34	148 (61.6)	37 (61.1)	185 (61.6)	
35–44	24 (10.0)	8 (18.9)	32 (10.7)	
Total	240 (100.0)	60 (100.0)	300 (100.0)	

Results

The GBS colonization rate was 20% (60/300) among three hundred pregnant women and 26.6% (16/60) in neonates born of GBS-positive mothers (**Table 3**). In this study, the youngest woman was 15 years old, and the oldest woman was 44 years old, with the average age of participants being 28 years. The various sociodemographic variables are shown in **Table 4** and **Table 5**. On comparing the variations in GBS colonization rates between rural and urban residents, a statistically significant difference was found for GBS colonization among GBS-positive women (78.3% in rural residents versus 21.7% in urban residents; *p* = 0.015).



Electrophoresis of PCR product for *atr* gene on agarose gel. Lane M represents 100 bp DNA ladder, every lane (1–13) except lane 7 represented positive results. Lanes NC and PC represented negative and positive controls respectively.

Table 6. Antimicrobial sensitivity of maternal and neonate isolates

Antimicrobial agent	Sensitivity of GBS Isolates	
	mothers (n = 60), n (%)	neonates (n = 16), n (%)
Penicillin	60 (100.0)	16 (100.0)
Ampicillin	60 (100.0)	16 (100.0)
Levofloxacin	55 (91.6)	15 (93.7)
Vancomycin	60 (100.0)	16 (100.0)
Tetracycline	8 (13.3)	4 (25.0)
Ceftriaxone	60 (100.0)	16 (100.0)
Erythromycin	50 (83.3)	13 (81.2)
Chloramphenicol	56 (93.3)	15 (93.7)
Ciprofloxacin	58 (96.6)	16 (100.0)

Molecular detection of all GBS isolates

Conventional PCR was used to detect a specific gene (*atr*) to confirm the bacteriological identification of *Streptococcus agalactiae*. This gene had a molecular size of 780 bp in gel electrophoresis as shown in **Figure**.

Antimicrobial sensitivity

The susceptibility of the isolates towards antibiotics is shown in **Table 6**. Based on the results of antimicrobial sensitivity, it was found that there is more than one antibiotic capable of inhibiting the growth of this bacteria, so they can be used as alternatives in the event of a drug allergy in the patient.

Discussion

Due to the possibility of transmission from the mother to the fetus throughout the pregnancy and the postpartum period, resulting in serious illness or death, research into maternal GBS colonization is crucial. The effect of GBS infection is not restricted to childhood only but may continue to adulthood and may lead to dangerous neurological disorders. The prevalence of GBS maternal colonization worldwide is variable because this prevalence depends on many variable factors like hygienic conditions, socio demographic conditions, sample population, diagnostic techniques, and others. Our research is a conformational vertical transmission study conducted in Babylon (Iraq). This is also the first GBS cohort study that has been done in Babylon. 20% of pre-delivery mothers and 26.6% of neonates born of GBS-positive mothers were found to be colonized with GBS. The colonization rate in mothers observed in our study was comparable to the global data [8, 11].

The percentage of vertical transmission of GBS from infected mothers to neonates in the present study (26.6%) falls within the global report ranges. Compared to other global publications, however, this fraction of vertical transmission is lower than in studies conduct-

ed in Kuwait (35.5%), Bangladesh (38.0%) [17], China (7.6–16.7%) [19–21], the United States (53.8%) [22], and Eastern Ethiopia (53.8%) [23]. Other studies, such as those conducted by A. Joachim *et al.* in 2009 in Dar es Salaam, Tanzania (8.9%) [24] and by M. Gizachew *et al.* in Northwest Ethiopia was 10.4% [25], have shown results lower than that in the current study. Our explanation for this variation can be attributed to many reasons such as sample size, techniques used in diagnosis, period of stay in the delivery canal, premature rupture of membrane, and prophylaxis treatment by mothers.

The high vertical transmission rate of GBS contributes to substantial newborn and maternal morbidity and fatality. Vertical transmission of GBS can be prevented, hence healthcare practitioners and government officials must take this into account when developing initiatives to reduce maternal and newborn mortality [26]. Vertical transmission of GBS from a colonized woman to her neonate has not been explored properly, particularly in low income countries. A study investigating the risk variables that could be linked to vertical transmission would therefore help with the formulation of prevention measures. In the present study, we found that three maternal risk factors, mother work and antenatal care follow-up, were strongly associated with the vertical transmission of GBS from asymptomatic colonized mothers to their newborns. Women who had 4–5 ANC visits throughout their current pregnancy had a 20.9% lower risk of vertical GBS transmission to their neonates [17]. According to several studies, GBS colonization in pregnancy may be linked to a variety of factors including education, parity, mother's age, status of marriage, occupation, and an elevated body mass index [27, 28]. A substantial threat for morbidity and death rate in neonates with early-onset GBS illness has been linked to the colonization of the mother's birth canal.

This study showed statistically significant differences between GBS colonization in women in rural areas compared to those in urban areas (78.3% for rural versus 21.7% for urban; $p = 0.015$). This data disagrees with a study conducted in China by S. Li *et al.* in 2018, which showed no significant difference between women residing in rural and urban areas [29]. The plausible explanation for this difference is a lot of variables that make it easier for GBS to spread in rural regions such as low educational status, lack of health care facilities, and contamination from water and other sources. Furthermore, in this study, the neonatal samples were taken from three sites to increase the chance of GBS detection. The sample locations may influence vertical transmission rates. According to a study conducted in Pakistan [30], the risk of acquiring newborn GBS infection was much higher in sites like abdominal skin (53%) than in ear canals (18%). Furthermore, two Turkish studies published in the same year found that the rate of vertical transmission was 54.2% for three sites (throat, ear canal, and umbilicus) and 15.2% for

two sites (throat and umbilicus) [31, 32]. In terms of parity, the prevalence of GBS colonization in our study was greater in more than three parities; the colonization rate of GBS in relation to parity was the highest during the reproductive years [33, 34]. The actual causes of such variable colonization are unknown and require additional research [35]. Thus, further research should be conducted to analyze the association of parity of women with GBS colonization.

The majority (61.6%) of participants in this study were between the ages of 25 and 34 years and had been pregnant at least once. This data differed from a similar study conducted by C. Turner et al. in 2012 on a population of refugees along the Thailand-Myanmar border in Southeast Asia, in which, most of the carriers were in their 20s [36]. These outcomes are similar to those of C. Adware et al. from Cameroon in 2008 [37], P. Foumane et al. in 2002 in Cameroon [38], A. Mengist et al. in 2016 in Ethiopia [39], and N.M. Nkembe et al. in 2018 [40], who reported the values to be 75%, 60%, 64%, and 65%, respectively. Our explanations for this age range consist of two reasons, firstly, some women delay pregnancy due to the presence of health issues that prevent pregnancy at the start of a marriage, and secondly, some married couples delay childbearing in the initial years of marriage. In particular, each and every GBS strain was susceptible to penicillin, ampicillin, vancomycin, and ceftriaxone indicating that these antibiotics could be used for preventative purposes. The majority of isolates obtained from mothers were sensitive to ciprofloxacin (96.6%), chloramphenicol (93.3%), levofloxacin (91.6%), and erythromycin (83.3%). In 87% (50/60) of isolates, tetracycline resistance was observed. In other nations such as Tunisia (97.3%) [41] and Iran (96%) [42], tetracycline resistance was extremely prevalent. Its use is currently restricted since the emergence of resistance appears to be linked to the extensive administration of antibiotics [43] and efficient plasmid transfer [43]. Penicillin is the drug of choice for treatment. In the case of penicillin allergy and anaphylaxis, ampicillin or vancomycin might be used as an alternative for treatment.

Nonetheless, the use of PCR to identify GBS and other pathogenic bacteria is crucial. This technique is considered a crucial method in the medical field, it is utilized in a number of medical fields to identify clinical diseases [44–48] and other dangerous genetic diseases such as cancers [49–64].

Conclusion

According to our findings which have demonstrated a high frequency of GBS infection in pregnant women and their newborns, a mandatory screening test for all pregnant women should be implemented, as well as preventive medication should be provided, to avoid the potentially fatal effects of this illness.

REFERENCES | СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Edwards M.S., Baker C.J. *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*). In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. Elsevier; 2010.
2. Seale A.C., Bianchi-Jassir F., Russell N.J., et al. Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S200–19. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix664>
3. Parks T., Barrett L., Jones N. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *Br. Med. Bull.* 2015;115(1):77–89. DOI: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv027>
4. Lawn J.E., Cousens S., Zupan J.; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? where? why? *Lancet.* 2005;365(9462):891–900. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)71048-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)71048-5)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Early-onset and late-onset neonatal group B streptococcal disease – United States, 1996–2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2005;54(47):1205–8.
6. Russell N.J., Seale A.C., O’Sullivan C., et al. Risk of early-onset neonatal group B streptococcal disease with maternal colonization worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S152–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix655>
7. Bianchi-Jassir F., Seale A.C., Kohli-Lynch M., et al. Preterm birth associated with group B *Streptococcus* maternal colonization worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S133–42. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix661>
8. Le Doare K., O’Driscoll M., Turner K., et al. Intrapartum antibiotic chemoprophylaxis policies for the prevention of group B streptococcal disease worldwide: systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S143–51. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix654>
9. Baker C.J., Barrett F.F. Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J. Pediatr.* 1973;83(6):919–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80524-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80524-4)
10. Verani J.R., McGee L., Schrag S.J. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease – revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 2010; 59(RR-10):1–36.
11. Russell N.J., Seale A.C., O’Driscoll M., et al. GBS Maternal Colonization Investigator Group. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S100–11. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix658>
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne; 2017.
13. Dilrukshi G.N., Kottahachchi J., Dissanayake D.M., et al. Group B *Streptococcus* colonisation and their antimicrobial susceptibility among pregnant women attending antenatal clinics in tertiary care hospitals in the Western Province of Sri Lanka. *J. Obstet. Gynaecol.* 2021;41(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1716313>
14. Kudagammana H.D., Rathnayaka R.M., Weerasooriya B.W., et al. Group B streptococcal colonisation among Sri Lankan mothers. *SCIREA J. Clin. Med.* 2019;4(6):209–15.
15. Sapugahawatte D.N., Li.C., Liyanapathirana V., et al. Colonization of group B *Streptococcus* in pregnant women and their neonates from a Sri Lankan hospital. *Pathogens.* 2022;11(4):386. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11040386>
16. Schörner M.A., Feuershuetten O.H., Scheffer M.C., et al. Detection of group B *Streptococcus agalactiae* from anorectal and

- vaginal screening tests. *Clin. Microbiol.* 2014;3(5). DOI: <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000169>
17. Al-Sweih N., Hammoud M., Al-Shimmiri M., et al. Serotype distribution and mother-to-baby transmission rate of *Streptococcus agalactiae* among expectant mothers in Kuwait. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2005;272(2):131–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00404-004-0705-z>
 18. Saha S.K., Ahmed Z.B., Modak J.K., et al. Group B Streptococcus among pregnant women and newborns in Mirzapur, Bangladesh: colonization, vertical transmission, and serotype distribution. *J. Clin. Microbiol.* 2017;55(8):2406–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00380-17>
 19. Chen J., Fu J., Du W., et al. Group B streptococcal colonization in mothers and infants in western China: prevalences and risk factors. *BMC Infect. Dis.* 2018;18(1):291. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3216-4>
 20. Chen Z., Wu C., Cao X., et al. Risk factors for neonatal group B streptococcus vertical transmission: a prospective cohort study of 1815 mother–baby pairs. *J. Perinatol.* 2018;38(10):1309–17. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41372-018-0182-z>
 21. Yang M.J., Sun P.L., Wen K.C., et al. Prevalence of maternal group B streptococcus colonization and vertical transmission in low-risk women in a single institute. *J. Chin. Med. Assoc.* 2012;75(1):25–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.10.011>
 22. Hickman M.E., Rench M.A., Ferrieri P., et al. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics.* 1999;104(2 Pt. 1):203–9. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.104.2.203>
 23. Yadeta T.A., Worku A., Egata G., et al. Vertical transmission of group B *Streptococcus* and associated factors among pregnant women: a cross-sectional study, Eastern Ethiopia. *Infect. Drug Resist.* 2018;11:397–404. DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s150029>
 24. Joachim A., Matee M.I., Massawe F.A., et al. Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC Public Health.* 2009;9:437. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-437>
 25. Gizachew M., Tiruneh M., Moges F., et al. Proportion of *Streptococcus agalactiae* vertical transmission and associated risk factors among Ethiopian mother-newborn dyads, Northwest Ethiopia. *Sci. Rep.* 2020;10(1):3477. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60447-y>
 26. Islam M.S., Saha S.K., Islam M., et al. Prevalence, serotype distribution and mortality risk associated with group B *Streptococcus* colonization of newborns in rural Bangladesh. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016;35(12):1309–12. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001306>
 27. Schuchat A., Oxtoby M., Cochi S., et al. Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J. Infect. Dis.* 1990;162(3):672–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/162.3.672>
 28. Stapleton R.D., Kahn J.M., Evans L.E., et al. Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 2005;106(6):1246–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000187893.52488.4b>
 29. Li S., Wen G., Cao X., et al. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: implication for vaccine development and insights into vertical transmission. *Vaccine.* 2018;36(15):1941–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.109>
 30. Chaudhry B.Y., Akhtar N., Balouch A.H. Vaginal carriage rate of group B *Streptococcus* in pregnant women and its transmission to neonates. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad.* 2010;22(4):167–70.
 31. Kadanali A., Altöparlak U., Kadanali S. Maternal carriage and neonatal colonisation of group B *Streptococcus* in eastern Turkey: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *Int. J. Cin. Pract.* 2005;59(4):437–40. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2005.00395>
 32. Eren A., Kucukercan M., Oguzoglu N., et al. The carriage of group B streptococci in Turkish pregnant women and its transmission rate in newborns and serotype distribution. *Turk. J. Pediatr.* 2005;47(1):28–33.
 33. Berg A.W., Sprij A.J., Oostvogel P.M., et al. Prevalence of colonisation with group B streptococci in pregnant women of a multi-ethnic population in the Netherlands. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2006;124(2):178–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.06.007>
 34. Munir S.K., Waheed K., Khanum A., et al. Frequency of group B streptococci in pregnant women in a tertiary care hospital. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2016;26(1):27–30.
 35. Khan M.A., Faiz A., Ashshi A.M. Maternal colonization of group B *Streptococcus* prevalence, associated factors and antimicrobial resistance. *Ann. Saudi Med.* 2015;35(6):423–7. DOI: <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2015.423>
 36. Turner C., Turner P., Po L., et al. Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border. *BMC Infect. Dis.* 2012;12:34. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-34>
 37. Adware C., Michel T., Paul A.J., et al. Vaginal colonization and resistance profile of group B *Streptococcus* among pregnant women in Yaoundé Gynaecology, Obstetric and Paediatric Hospital in Cameroon. *J. Clin. Med. Res.* 2014;6(3):16–21. DOI: <https://doi.org/10.5897/JCMR.2014.0249>
 38. Foumane P., Mboudou E., Dohbit J.S., et al. Group B beta hemolytic *Streptococcus* in pregnancy and its effect on maternal and foetal outcome in the Yaounde General Hospital: a descriptive study. *Clin. Mother Child Health.* 2009;6(1):995–1002.
 39. Mengist A., Kannan H., Abdissa A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of anorectal and vaginal group B *Streptococcus* isolates among pregnant women in Jimma, Ethiopia. *BMC Res. Notes.* 2016;9:351. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2158-4>
 40. Nkembe N.M., Kamga H.G., Baiye W.A., et al. *Streptococcus agalactiae* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern in vaginal and anorectal swabs of pregnant women at a tertiary hospital in Cameroon. *BMC Res. Notes.* 2018;11(1):480. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3589-x>
 41. Santhanam S., Jose R., Sahni R.D., et al. Prevalence of group B streptococcal colonization among pregnant women and neonates in a tertiary hospital in India. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* 2017;18(4):181–4. DOI: <https://doi.org/10.4274/jtgga.2017.0032>
 42. Campbell J.R., Hillier S.L., Krohn M.A., et al. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet. Gynecol.* 2000;96(4):498–503. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)00977-7](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)00977-7)
 43. Burdett V. Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980;18(5):753–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.18.5.753>
 44. Husain A.G., Alrubaii B.A. Molecular detection and expression of virulence factor encoding genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Biomedicine.* 2023;43(5):1514–9. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i5.3263>
 45. Saleh T.H., Hashim S.T., Malik S.N., et al. The impact some of nutrients on swarming phenomenon and detection the responsible gene RsbA in clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2020;11(1):437–44. DOI: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i1.1839>
 46. Sabah Fakhry S., Noori Hamed Z., Abdul-elah Bakir W., Abdullah Laftaah ALRubaii B. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from humans and food sources by Use of mecA 1 and mecA 2 genes in Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique. *Revis Bionatura.*

- 2022;7(2):44. DOI: <https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.44>
47. Ali M.A., Al-Rubaii B.A. Study of the effects of audible sounds and magnetic fields on *Staphylococcus aureus* methicillin resistance and *mecA* gene expression. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 2023;5(5):825–830. DOI: [org/10.26538/tjnpr/v5i5.6](https://doi.org/10.26538/tjnpr/v5i5.6)
48. Mohsin M.R., AL-Rubaii B.A. Bacterial growth and antibiotic sensitivity of *Proteus mirabilis* treated with anti-inflammatory and painkiller drugs. *Biomedicine.* 2023;43(2):728–34. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i02.2693>
49. Bassi A.G., Al-Rubaii B.A. Detection of pyocin S and the effects of lactobacillus acidophilus cell-free supernatants on multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of Baghdad Hospitals. *J. Commun. Dis.* 2024;56(1):135–44. DOI: <https://doi.org/10.24321/0019.5138.202418>
50. Abbas M.S., Ahmed A.G., Ali S.Q., et al. Immunological inflammatory factors in patients diagnosed with COVID-19. *Biomedicine.* 2023;43(1):230–5. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i1.2413>
51. Al-Saadi H.K., Awad H.A., Saltan Z.S., et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Allium sativum* ethanol extract and silver nanoparticles. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 2023;7(6):3105–10. DOI: <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i6.5>
52. Hassoon A.H. Evaluating the role of mitochondrial DNA quantification in blastocyst transfers potential. *AIP Conf. Proc.* 2022;2386(1):020046. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0067093>
53. Buniya H.K., Hassoon A.H., Hameed A.K. Molecular genetic variability in the d-loop region for females with breast cancer and the effect of the chemotherapy. *Res. J. Pharm. Technol.* 2018;11(9):3787–92. DOI: <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00694.7>
54. Rasoul L.M., Marhoon A.A., Albaayit S.F., et al. Cytotoxic effect of cloned EGFP gene on NCI-H727 cell line via geneticaly engineered gene transfer system. *Biomedicine.* 2022;42(5):938–42. DOI: <https://doi.org/10.51248/v42i5.1934>
55. Bresam S., Al-Jumaily R.M., Karim G.F., et al. Polymorphism in SNP rs972283 of the KLF14 gene and genetic disposition to peptic ulcer. *Biomedicine.* 2023;43(1):216–20. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i1.2411>
56. Al-Jumaily R.M., AL-Sheakli I.I., Muhammed H.J., et al. Gene expression of Interleukin-10 and Foxp3 as critical biomarkers in rheumatoid arthritis patients. *Biomedicine.* 2023;43(4):1183–7. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i4.3107>
57. Sultan R.S., Al Khayali B.D., Abdulmajeed G.M., et al. Exploring small nucleolar RNA host gene 3 as a therapeutic target in breast cancer through metabolic reprogramming. *Opera Med. Physiol.* 2023;10(4):36–47. DOI: <https://doi.org/10.24412/2500-2295-2023-4-36-47>
58. Ismael M.K., Qaddoori Y.B., Shaban M.N., et al. The immunohistochemical staining of Vimentin and E-Cadherin in bladder cancer patients infected with hepatitis C virus. *J. Pure Appl. Microbiol.* 2023;17(2):1009–16. DOI: <https://doi.org/10.22207/JPAM.17.2.30>
59. Bresam S., Alhumairi R.M.A.U., Hade I.M., et al. Genetic mutation rs972283 of the KLF14 gene and the incidence of gastric cancer. *Biomedicine.* 2023;43(4):1256–60. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i1.2411>
60. Hamoode R.H., Alkubaisy S.A., Sattar D.A., et al. Detection of anti-testicular antibodies among infertile males using indirect immunofluorescent technique. *Biomedicine.* 2022;42(5):978–82. DOI: <https://doi.org/10.51248/v42i5.1963>
61. Mohammed R.A., Al-Asady Z.T.S., Frayyeh M.J. et al. The influence of radiotherapy exposure on anti-TPO Ab, anti-Tg Ab, anti-nuclear Ab, anti-DSA Ab and complete blood markers in hospital physician workers in Nuclear Baghdad Hospital. *Opera Med. Physiol.* 2024;11(2):5–15. DOI: [10.24412/2500-2295-2024-2-5-15](https://doi.org/10.24412/2500-2295-2024-2-5-15)
62. Hadi S.T., Hashim S., Abdulrazaq Al-Obaidi R.A., et al. A biological study of chitinase produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of chia responsible gene. *Int. J. R. Pharm. Sci.* 2020;11(2):1318–30. DOI: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i2.1989>
63. Jawad N.K., Numan A.T., Ahmed A.G., et al. IL-38 gene expression: a new player in Graves' ophthalmopathy patients in Iraq. *Biomedicine.* 2023;43(1):210–5. DOI: <https://doi.org/10.51248/v43i1.2027>
64. Шалепо К.В., Хуснугдинова Т.А., Будиловская О.В. и др. Молекулярно-генетические детерминанты вирулентности *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорожденных Санкт-Петербурга и Ленинградской области в 2010–2023 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(2):217–26. Shalepo K.S., Khusnutdinova T.A., Budilovskaya O.V., et al. Molecular genetic determinants of virulence of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region in 2010–2023. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2024; 101(2):217–26. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-501> EDN: <https://elibrary.ru/qnunfe>

Информация об авторах

Ali D. Marhash[✉] — отдел медицинских лабораторий, Технический институт Вавилона, Технический университет Аль-Фурат Аль-Аусат, Вавилон, Ирак, alidmarhash@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1078-0541>

Zainab N. Nabat — отдел медицинских лабораторий, Технический институт Вавилона, Технический университет Аль-Фурат Аль-Аусат, Вавилон, Ирак, <https://orcid.org/0000-0001-5517-8146>

Nawras A. Abbas — отдел общественного здравоохранения, Технический институт Вавилона, Технический университет Аль-Фурат Аль-Аусат, Вавилон, Ирак, <https://orcid.org/0000-0002-5818-5525>

Участие авторов: Marhash A.D. — проведение и написание исследований, сбор образцов и анализ данных; Nabat Z.N. — анализ данных и сбор ссылок; Abbas N.A. — сбор образцов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 27.07.2024;
принята к публикации 15.10.2024;
опубликована 30.10.2024

Information about the authors

Ali D. Marhash[✉] — Department of medical laboratories, Babylon Technical Institute, Al Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq, alidmarhash@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1078-0541>

Zainab N. Nabat — Department of medical laboratories, Babylon Technical Institute, Al Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq, <https://orcid.org/0000-0001-5517-8146>

Nawras A. Abbas — Department of community health, Babylon Technical Institute, Al Furat Al-Awsat Technical University, Babylon, Iraq, <https://orcid.org/0000-0002-5818-5525>

Author contribution: Marhash A.D. — conducting and writing research, collection of samples, and data analyses; Nabat Z.N. — analysis of data and collection of references; Abbas N.A. — collection of samples. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 27.07.2024;
accepted for publication 15.10.2024;
published 30.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>



Использование отечественного бульона Мюллера–Хинтон для исследования антибиотикочувствительности клинических штаммов микроорганизмов

Косилова И.С.[✉], Домотенко Л.В., Храмов М.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

Аннотация

Введение. Одна из причин распространения микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), связана с бесконтрольным употреблением и неадекватным эмпирическим назначением антибиотиков, не основанным на результатах определения чувствительности возбудителя к ним. Метод разведений в бульоне и один из вариантов его исполнения — референтный метод микроразведений, в отличие от диско-диффузионного метода, позволяет тестировать практически все комбинации патоген–антибиотик. Для выполнения метода в рамках программы импортозамещения разработана технология производства отечественного бульона Мюллера–Хинтон (МХБ-Оболенск).

Цель исследования — оценить качество разработанного отечественного бульона МХБ-Оболенск в сравнительных испытаниях с импортным аналогом МХБ-BD («BD BBL») при тестировании клинических штаммов микроорганизмов, включая комбинации микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Материалы и методы. В работе исследовали чувствительность 47 клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий к АМП различных функциональных групп методом микроразведений в бульонах МХБ-Оболенск и МХБ-BD.

Результаты. Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков для клинических штаммов, полученные на разработанной и контрольной средах, между собой практически не отличались или отличались на ± 1 разведение. Отличие на 2 двукратных разведения отмечено при тестировании комбинаций *Enterococcus faecium*–ампициллин, *Klebsiella pneumoniae*–меропенем, *Pseudomonas aeruginosa*–левофлоксацин и *Staphylococcus aureus*–ципрофлоксацин. Для двух первых комбинаций значения МПК на МХБ-Оболенск были ниже, а для двух последних — выше, чем на МХБ-BD. Полученные различия не отразились на клинических категориях чувствительности.

Заключение. На разработанном отечественном бульоне МХБ-Оболенск получены антибиотикограммы для клинических штаммов микроорганизмов, которые не отличались от их антибиотикограмм на контрольной среде. МХБ-Оболенск соответствует требованиям национальных и международных стандартов и с помощью него можно достоверно тестировать в том числе актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя исследовать диско-диффузионным методом.

Ключевые слова: бульон Мюллера–Хинтон, импортозамещение, метод микроразведений в бульоне

Этическое утверждение. В исследовании использованы только музейные штаммы микроорганизмов, поэтому не требуется представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

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: Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Использование отечественного бульона Мюллера–Хинтон для исследования антибиотикочувствительности клинических штаммов микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):820–827.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>

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

Analysis of antibiotic sensitivity of clinical strains of microorganisms with the Russian Mueller–Hinton broth

Irina S. Kosilova[✉], Lyubov V. Domotenko, Mikhail V. Khramov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Abstract

Introduction. One of the reasons for spreading antibiotic-resistant microorganisms is the uncontrolled use and inadequate empirical prescription of antibiotics which is not based on the results of the pathogen sensitivity testing. The broth dilution method and one of its implementation options, the reference microdilution method, in contrast to the disk diffusion method, allows testing virtually all pathogen-antibiotic combinations. To realize the method, a production technology of Russian Mueller–Hinton broth (MHB-Obolensk) has been developed under the import substitution program.

The aim. To evaluate the quality of the developed domestic Mueller–Hinton broth in comparative tests with its imported analog BD BBL (MHB-BD) in testing clinical strains of microorganisms, including microorganism–antibiotic combinations pairs which cannot be reliably investigated by the disc diffusion method.

Materials and methods. The study investigated the sensitivity of 47 clinical strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria to antibiotics of various functional groups using the broth microdilution method with MHB-Obolensk and MHB-BD.

Results. The MICs values of antibiotics for clinical strains obtained with the developed and control media did not practically differ from each other or differed by +/- one dilution. The difference by two two-fold dilutions was noted when testing *Enterococcus faecium*–ampicillin, *Klebsiella pneumoniae*–meropenem, *Pseudomonas aeruginosa*–levofloxacin and *Staphylococcus aureus*–ciprofloxacin combinations. For the first two combinations, the MIC values were lower in MHB-Obolensk, and for the last two, they were higher than in MHB-BD. The differences obtained did not affect the clinical categories of sensitivity.

Conclusion. The antibiograms of clinical strains in developed Russian Mueller–Hinton broth was obtained, which did not differ from those for the comparison medium. MHB-Obolensk complies with the requirements of national and international standards and can be used to reliably test, among other things, current combinations of microorganism–antibiotic pairs that cannot be studied using the disk diffusion method.

Keywords: *Mueller–Hinton broth, import substitution program, broth microdilution method.*

Ethics approval. Only museum strains of microorganisms were used in the study; therefore, no biomedical ethics committee opinion or other documents are required to be submitted.

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

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest relating to the publication of this article.

For citation: Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V. Analysis of antibiotic sensitivity of clinical strains of microorganisms with the Russian Mueller–Hinton broth *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(6):820–827.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>

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

Введение

Масштабное распространение бактерий, устойчивых к различным группам антибиотиков, продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения во всём мире [1]. Наибольшее количество случаев устойчивости — среди инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, включая *Acinetobacter baumannii*, представителей семейства *Enterobacteriales*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. [2]. По оценкам экспертов, только за 2019 г. в мире выявлено около 5 млн случаев смертей, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам [3], включая туберку-

лёз с множественной лекарственной устойчивостью или устойчивостью к рифампицину¹.

Пандемия COVID-19 усугубила существующее глобальное бремя антибиотикорезистентности, главным образом, из-за неправильного и чрезмерного использования антибиотиков [5].

Ситуация с растущей угрозой устойчивости к антибиотикам осложняется из-за существенного снижения числа разработок новых антимикробных

¹ Tuberculosis: Multidrug-resistant (MDR-TB) or rifampicin-resistant TB (RR-TB). 2024. URL: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-\(mdr-tb\)](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-(mdr-tb))

препаратов (АМП), что обусловлено длительностью процедуры от разработки до внедрения, высокой стоимостью и низкой окупаемостью затрат. В настоящее время требуется около 10–15 лет для продвижения антибиотика-кандидата от доклинической до клинической стадии испытаний [6]. Учитывая критическую необходимость в новых антибиотиках, в 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список резистентных бактерий, представляющих наибольшую опасность жизни и здоровью людей², в 2024 г. вышел обновлённый список³. В обновлённом списке исключены 5 комбинаций патоген–антибиотик (*Helicobacter pylori*, устойчивая к кларитромицину; *Campylobacter* spp., устойчивый к фторхинолонам; *Streptococcus pneumoniae*, устойчивый к пенициллину; *Providencia* spp., устойчивая к цефалоспориному третьего поколения; *S. aureus*, устойчивый к ванкомицину), которые содержались в списке 2017 г., и добавлены 4 новые комбинации бактерия–антибиотик: *Streptococcus group A*, устойчивый к макролидам; *Streptococcus group B*, устойчивый к пенициллину; *S. pneumoniae*, устойчивый к макролидам; *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивая к рифампицину. *P. aeruginosa*, устойчивая к карбапенемам, перешла из группы критического уровня приоритетности в группу высокого уровня приоритетности в связи с сообщениями о снижении её глобальной устойчивости к антибактериальным препаратам.

Ещё одна причина появления микроорганизмов, устойчивых к АМП, связана с бесконтрольным и необоснованным использованием антибиотиков, а также неадекватным эмпирическим назначением антибиотиков без учёта результатов определения чувствительности к ним. В настоящее время самым распространённым методом определения чувствительности микроорганизмов остается диско-диффузионный метод. Он прост в выполнении и не требует дорогостоящего оборудования. Однако некоторые комбинации микроорганизм–АМП нельзя достоверно тестировать данным методом, что может привести к неправильному назначению схем лечения и ещё больше усугубить ситуацию с распространением антибиотикорезистентности.

Таких ограничений лишён метод разведений в бульоне и особенно один из вариантов его исполнения — метод микроразведений, который признан референтным. Это количественный метод, применение которого позволяет определять значения

минимальных подавляющих концентраций (МПК) АМП, наиболее точно отражающие антимикробный эффект *in vitro* и необходимые для оптимизации режима дозирования АМП⁴.

Метод позволяет тестировать такие комбинации микроорганизм–антибиотик, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом и часть из которых входит в список ВОЗ: *Salmonella* spp., устойчивая к ципрофлоксацину; *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивая к цефалоспоридам и фторхинолонам; *S. pneumoniae* и стрептококки группы А, устойчивые к макролидам (азитромицину, кларитромицину и рокситромицину в случае устойчивости к эритромицину); небрюшнотифозные сальмонеллы, устойчивые к фторхинолонам (ципрофлоксацину), и др.

Для постановки метода рекомендуется использовать бульон Мюллера–Хинтон (МХБ), стандартизованный по содержанию ионов двухвалентных металлов, тимидина и значению pH из-за их влияния на активность некоторых антибиотиков. До недавнего времени промышленное производство МХБ в России отсутствовало, а сложившаяся ситуация с введением экономических санкций в отношении нашей страны привела к ограничению экспорта продукции для проведения микробиологических исследований. В связи с этим в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии разработана технология производства и налажен промышленный выпуск МХБ (РУ № РЗН 2023/21584 от 29.11.2023). Бульон апробирован на расширенном наборе тест-штаммов и АМП, а данное исследование посвящено изучению возможности его применения при тестировании клинических штаммов микроорганизмов.

Цель исследования — оценить качество разработанного отечественного МХБ в сравнительных испытаниях с импортным аналогом при тестировании грамотрицательных и грамположительных клинических штаммов микроорганизмов, включая актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Материалы и методы

Питательные среды

В работе использовали МХБ производства ГНЦ ПМБ (МХБ-Оболensk; кат. № О-282-К-1),

² WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. URL: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

³ WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

⁴ ГОСТ Р ИСО 20776-1. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. М.; 2022. 24 с.

а также МХБ производства «BD BBL» (МХБ-BD; кат. № 212322) в качестве контрольной среды. При тестировании прихотливых микроорганизмов в бульоны добавляли 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD («Sigma-Aldrich», кат. № N8535). Лизированную лошадиную кровь готовили из дефибрированной лошадиной крови («Эколаб»), для чего в дефибрированную лошадиную кровь добавляли стерильную деионизированную воду в соотношении 1 : 1, помещали в морозильную камеру на 8 ± 1 ч при -20°C . Затем размороженную при комнатной температуре кровь повторно подвергали замораживанию/оттаиванию, повторяя данный цикл 4 раза до полного лизиса кровяных клеток. После этого лизированную лошадиную кровь осветляли центрифугированием при 7000 об/с в течение 30 мин на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 5702».

Исследуемые штаммы микроорганизмов

В работе тестировали штаммы микроорганизмов, находящиеся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболensk):

- 44 клинических штамма микроорганизмов, ранее выделенных от пациентов, находившихся на лечении в стационаре Областной инфекционной клинической больницы Ярославской области и депонированных в ГКПМ-Оболensk: 14 штаммов *K. pneumoniae*, 8 штаммов *P. aeruginosa*, 4 штамма *A. baumannii*, 7 штаммов *Staphylococcus* spp. (*S. aureus* — 6, *S. epidermidis* — 1), 7 штаммов *Enterococcus* spp. (*E. faecium* — 4, *E. faecalis* — 1, *E. casseliflavus* — 1, *E. gallinarum* — 1), 2 штамма *Escherichia coli*, 1 штамм *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, 1 штамм *Morganella morganii*;
- 3 штамма кампилобактерий, выделенных из помета птиц фермерского хозяйства в Московской области и депонированных в ГКПМ-Оболensk (*C. jejuni* — 2, *C. coli* — 1);
- 5 тест-штаммов, используемых для повседневного контроля качества постановки тестирования и исследуемых в работе бульонов: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 и *C. jejuni* ATCC 33560.

Антимикробные препараты

В работе использовали субстанции АМП и лекарственных препаратов: амикацин (кат. № A1774), ампициллин (кат. № A9393), ванкомицин (кат. № 94747), гентамицин (кат. № G3632), имипенем (кат. № I0160), колистин (кат. № C4461), левофлоксацин (кат. № 28266), линезолид (кат. № PHR1885), меропенем (кат. № PHR1772), тетрацилин (кат. № T8032), тигециклин (кат. № PZ0021), триметоприм (кат. № T7883), цефтазидим (кат. № PHR1847),

ципрофлоксацин (кат. № 17850), эритромицин (кат. № E6376), сульфаметоксазол (кат. № S7507) — все производства «Sigma-Aldrich».

Метод микроразведений в бульоне

Постановку метода проводили с использованием 96-луночного планшета в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1⁴, а также актуальных версий EUCAST и Российских рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к АМП⁵. По полученным значениям МПК определяли категории чувствительности штаммов: S (чувствительные при стандартном режиме дозирования), R (резистентные), I (чувствительные при увеличенной экспозиции АМП). Тестирование всех комбинаций микроорганизм–АМП проводили в 3 повторностях.

Физико-химические показатели качества питательных сред

Физико-химические показатели качества бульонов (содержание аминного азота, содержание хлоридов в пересчёте на NaCl и потерю в массе при высушивании) определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08⁶. Содержание ионов кальция (Ca^{2+}), магния (Mg^{2+}), марганца (Mn^{2+}) и цинка (Zn^{2+}) определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на плазменном спектрометре «iCAP-6500 Duo» («Thermo Scientific») в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 27085-2012⁷.

Содержание тимидина оценивали косвенным методом путём определения значения МПК триметоприма/сульфаметоксазола при исследовании контрольного штамма *E. faecalis* ATCC 29212. Получение МПК $\leq 0,5/9,5$ мг/л свидетельствовало о допустимой концентрации тимидина в бульоне менее 0,03 мг/л⁸.

⁵ European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_14.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf; Российские рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02). КМАХ. 2024;26(2). URL: <https://microbius.ru/library/rossiyskie-rekomendatsii-opredelenie-chuvstvitelnosti-mikroorganizmov-k-antimikrobnym-preparatam>

⁶ МУК 4.2.2316-08. 4.2. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.; 2008.

⁷ ГОСТ Р ИСО 27085-2012. Корма для животных. Определение содержания кальция, натрия, фосфора, магния, калия, железа, цинка, меди, марганца, кобальта, молибдена, мышьяка, свинца и кадмия методом ИСП – АЭС. М.; 2014.

⁸ ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016. Клинические лабораторные исследования. Критерии приемлемости партий дегидратированных агара и бульона Мюллера–Хинтон, применяемых для оценки чувствительности к антибиотикам. М.; 2021. 30 с.

Статистические методы

Результаты обрабатывали при помощи пакета программ «MS Excel». Достоверность различных средних величин оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. В сравнительном анализе использовали двусторонний критерий Фишера, уровень значимости $p < 0,05$.

Для тест-штаммов микроорганизмов полученные значения МПК антибиотиков сравнивали с целевыми значениями и допустимыми диапазонами. Полученные результаты в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010⁹ представляли в следующих оценочных категориях:

- С — среднее значение соответствует целевому значению;
- Н — High, среднее значение выше целевого на 1 двукратное разведение;
- L — Low, среднее значение ниже целевого на 1 двукратное разведение;
- VH — Very high, среднее значение выше целевого на 2 двукратных разведения, но находится в диапазоне допустимых значений;
- VL — Very low, среднее значение ниже целевого на 2 двукратных разведения, но находится в диапазоне допустимых значений;
- LE — Low error, среднее значение меньше нижнего допустимого;
- HE — High error, среднее значение больше верхнего допустимого.

Результаты

Перед началом исследования проводили контроль качества МХБ-Оболенск с использованием контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. jejuni* ATCC 33560 и антибиотиков, результаты определения чувствительности к которым зависят от качества используемого МХБ [9–11]. При выборе антибиотиков исходили из следующих требований стандартов: для получения достоверных результатов тестирования чувствительности к тетрациклинам, пенициллинам, аминогликозидам, макролидам и фторхинолонам рекомендовано использовать МХБ с оптимальным значением рН 7,2–7,4. Для аминогликозидов, тетрациклинов и фторхинолонов среда должна быть строго сбалансирована по содержанию ионов кальция и магния, для тигециклина и карбапенемов — по концентрации ионов марганца и цинка соответственно, а для сульфаниламидных препаратов критической явля-

ется концентрация тимидина в бульоне.

В ходе контроля качества на МХБ-Оболенск получены значения МПК антибиотиков, которые были отнесены к категории С в 84,4% случаев. К категории Н отнесены полученные значения МПК антибиотиков в 8,0% случаев, а в остальных 7,6% случаев полученные значения МПК были квалифицированы как L. Значений, отнесённых к категориям VH, VL, LE и HE, в ходе исследования не получено. Значения МПК антибиотиков для тест-штаммов, определённые на контрольной среде МХБ-BD, также не выходили за рамки допустимых интервалов. Полученные результаты свидетельствовали о высоком качестве проанализированных питательных сред и о возможности их использования для исследования клинических штаммов.

При дальнейшем исследовании на разработанном и контрольном бульонах изучена чувствительность представителей *Enterobacteriales* (*K. pneumoniae*, *E. coli* и *M. morgani*) к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ципрофлоксацину, ампициллину, колистину, гентамицину и триметоприму/сульфаметоксазолу, а *E. coli* — дополнительно к тигециклину, *P. aeruginosa* — к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ципрофлоксацину и колистину, *A. baumannii* — к имипенему, меропенему, левофлоксацину, ципрофлоксацину, колистину гентамицину, *Campylobacter* spp. — к ципрофлоксацину, тетрациклину и эритромицину, *Staphylococcus* spp. — к левофлоксацину, ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину, тетрациклину, гентамицину, эритромицину, тигециклину и триметоприму/сульфаметоксазолу, *Enterococcus* spp. — к имипенему, левофлоксацину, ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину, ампициллину и тигециклину, *C. pseudodiphtheriticum* — к ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину и тетрациклину.

Значения МПК антибиотиков, полученные на МХБ-Оболенск и контрольном МХБ-BD, между собой практически совпадали. При тестировании 8 комбинаций АМП-микроорганизм отмечены различия МПК на 1 двукратное разведение. Для 4 комбинаций на МХБ-Оболенск они превышали значения на контрольном бульоне и составили для меропенема 0,12 мг/л против 0,06 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 16, для имипенема — 0,06 мг/л против 0,03 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 203, для цефтазидима — 0,25 мг/л против 0,125 мг/л в отношении *E. coli* 1169/70, для левофлоксацина — 0,06 мг/л против 0,03 мг/л в отношении *A. baumannii* 494 к левофлоксацину. Для 4 комбинаций они, напротив, были ниже и составили для левофлоксацина 0,03 мг/л против 0,06 мг/л на контрольном бульоне в отношении *E. faecalis* 2211406, для тетрациклина — 16,0 мг/л против 32 мг/л в отношении *C. jejuni* F-2, для колистина — 0,25 мг/л против 0,5 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 1643, для ванкоми-

⁹ ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 2. Оценка функциональных характеристик изделий для испытания антимикробной чувствительности.

цина — 0,03 мг/л против 0,06 мг/л в отношении *S. aureus* 2202263.

Отличия между двумя МХБ в результатах МПК на 2 двукратных разведения отмечены при тестировании 4 комбинаций: *K. pneumoniae* 1142—меропенем, *P. aeruginosa* 265—левофлоксацин, *S. aureus* 2202309—ципрофлоксацин и *E. faecium* 613—ампициллин. При этом на МХБ-Оболенск значения МПК левофлоксацина и ципрофлоксацина, равные оба и 0,12 мг/л, были выше, чем на контрольном бульоне (0,03 и 0,03 мг/л), а МПК меропенема и ампициллина, равное 0,06 и 0,03 мг/л соответственно, были ниже, чем на МХБ-ВД (0,016 и 0,008 мг/л).

Вместе с тем полученные различия в МПК не повлияли на оценку клинических категорий чувствительности исследованных клинических штаммов. Результаты тестирования чувствительности к АМП (в клинических категориях чувствительности) для 44 клинических штаммов микроорганизмов и 3 штаммов кампилобактерий, выделенных от сельскохозяйственных птиц, представлены в **таблице**.

Все исследуемые в работе штаммы *K. pneumoniae* в основном чувствительны при стандартном режиме дозирования к протестированным антибиотикам. Один штамм был устойчивым к цефтазидиму и ципрофлоксацину, 2 — к ампициллину, 3 — к гентамицину. Оба штамма *E. coli* оказались чувствительными при стандартном режиме дозирования к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ампициллину, тигециклину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Один из них проявил устойчивость к ципрофлоксацину, колистину и гентамицину, а второй к этим АМП был чувствителен. Штамм *M. morgani* интерпретирован как чувствительный при стандартном режиме дозирования к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ципрофлоксацину, ампициллину, колистину и триметоприму/сульфаметоксазолу, но устойчивый к гентамицину.

Анализ антибиотикограммы штаммов *P. aeruginosa* показал, что они чувствительны к меропенему, а при увеличенной экспозиции АМП также чувствительны к имипенему, цефтазидиму, левофлоксацину и ципрофлоксацину. Один из 8 протестированных штаммов псевдомонад проявил устойчивость к колистину, а 7 остальных — чувствительность к нему.

Штаммы *A. baumannii* чувствительны к имипенему, меропенему, левофлоксацину и колистину, а к ципрофлоксацину — при увеличенной экспозиции АМП. К гентамицину только 1 штамм был чувствителен, а остальные проявили устойчивость, как и все 4 протестированных штамма к триметоприму/сульфаметоксазолу.

Один штамм кампилобактерий проявил устойчивость к ципрофлоксацину, тетрациклину и эритромицину, два других — чувствительность к те-

трациклину и эритромицину и чувствительность, но при увеличенной экспозиции, к ципрофлоксацину.

Все исследованные грамположительные штаммы *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp. чувствительны к линезолиду. В отношении левофлоксацина и ципрофлоксацина все штаммы *Staphylococcus* spp. интерпретированы как чувствительные при увеличенной экспозиции АМП, а в отношении ванкомицина и тигециклина — как чувствительные при стандартном режиме дозирования. Один из 7 протестированных штаммов стафилококков проявил устойчивость к тетрациклину и эритромицину, а остальные — чувствительность при стандартном режиме дозирования. Относительно гентамицина и триметоприма/сульфаметоксазола только 4 штамма *Staphylococcus* spp. были чувствительны к данным АМП, а остальные 3 — устойчивы.

Все штаммы *Enterococcus* spp. к левофлоксацину, ципрофлоксацину и ампициллину чувствительны при стандартном режиме дозирования, а к имипенему — при увеличенной экспозиции. При этом 3 штамма *E. faecium* проявили устойчивость к ванкомицину и тигециклину, а 4 — чувствительность.

Штамм *S. pseudodiphtheriticum*, протестированный в комбинации с линезолидом, ванкомицином и тетрациклином, интерпретирован как чувствительный, а в комбинации с ципрофлоксацином — как устойчивый. С помощью контрольной питательной среды МХБ-ВД получены аналогичные антибиотикограммы для всех протестированных штаммов микроорганизмов.

Обсуждение

В данной работе на МХБ-Оболенск протестирована чувствительность грамотрицательных и грамположительных бактерий (включая прихотливые), выделенных от больных людей и сельскохозяйственных животных, к антибиотикам различных групп. В перечень АМП были включены антибиотики, чувствительность к которым не может быть определена диско-диффузионным методом (ципрофлоксацин только для сальмонелл, а ванкомицин и колистин — для всех микроорганизмов); антибиотики, выполняющие роль маркеров качества МХБ (тетрациклин, гентамицин, эритромицин, тигециклин, триметоприм/сульфаметоксазол, левофлоксацин, имипенем, меропенем, ампициллин) и другие (линезолид, цефтазидим) [9–11].

В ГНЦ ПМБ удалось сконструировать МХБ, удовлетворяющий требованиям национальных и международных стандартов, на основе специально разработанного солянокислотного гидролизата казеина модифицированного. Значение pH разработанного бульона находится в диапазоне 7,2–7,3, содержание ионов кальция — в диапазоне 20,0–25,0 мг/л, магния — 10,0–12,0 мг/л, уровень марганца в нем менее 8,0 мг/л, цинка — менее 3,0 мг/л,

Результаты тестирования клинических штаммов методом микроразведений в МХБ-Оболенск и МХБ-BD

Results of clinical strain testing by broth microdilution method using MHB-Obolensk and MHB-BD

АМП Antibiotics	Питательная среда Nutrient media	<i>K. pneumoniae</i> — 14		<i>E. coli</i> — 2		<i>M. morganii</i> — 1		<i>P. aeruginosa</i> — 8		<i>A. baumannii</i> — 4		<i>Campylobacter</i> spp. — 3		<i>Staphylococcus</i> spp. — 7		<i>Enterococcus</i> spp. — 7		<i>C. pseudodiphtheriticum</i> — 1	
		<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC
Имипенем Imipenem	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	–	–	7	I	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	–	–	7	I	–	–
Меропенем Meropenem	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	S	4	S	–	–	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	S	4	S	–	–	–	–	–	–	–	–
Цефтазидим Ceftazidime	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	1	R	2	S	1	S	8	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	13	S	2	S	1	S	8	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Левифлоксацин Levofloxacin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	7	I	7	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	7	I	7	S	–	–
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	1	R	1	R	1	S	8	I	4	I	1	R	7	I	7	S	1	R
	МХБ-BD МНВ-BD	13	S	1	S	1	S	8	I	4	I	2	I	7	I	7	S	1	R
Линезолид Linezolid	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	7	S	1	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	7	S	1	S
Ванкомицин Vancomycin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
Ампициллин Ampicillin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	2	R	2	S	1	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	12	S	2	S	1	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	–	–
Колистин Colistin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	1	R	1	S	1	R	7	S	4	S	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	1	R	1	S	1	R	7	S	4	S	–	–	–	–	–	–
Тетрациклин Tetracycline	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	R	2	S	6	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	S	6	S	–	–	1	S
Гентамицин Gentamicin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	3	R	1	R	1	R	–	–	3	R	–	–	3	R	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	11	S	1	S	1	R	–	–	1	S	–	–	4	S	–	–	–	–
Эритромицин Erythromycin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	R	2	S	6	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	S	6	S	–	–	–	–
Тигециклин Tigecycline	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	2	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	2	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim- sulfamethoxazole	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	–	–	4	R	–	–	3	R	4	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	–	–	4	R	–	–	3	R	4	S	–	–

Примечание. *n* — количество штаммов; КЧ — категория чувствительности. Проверк — тестирование к данному АМП не проводили; S — чувствительные при стандартном режиме дозирования; R — резистентные; I — чувствительные при увеличенной экспозиции АМП.
Note. *n* — number of strains; SC — sensitivity category. A dash — testing for this antibiotic has not been performed; S — sensitive to standard dosing regimen; R — resistant; I — sensitive to increased exposure to antibiotic.

тимидина — менее 0,03 мг/л. Другие физико-химические показатели качества, требования к которым не нормируются стандартом (см. сноску 8), не отличаются от таковых для импортного аналога: содержание аминного азота варьирует от 4,7 до 5,0%, хлоридов — от 27,5 до 28,7%, а потеря в массе при высушивании составляет 3,8–4,0%.

Использование МХБ с такими характеристиками позволило получить результаты категорий чувствительности 47 клинических штаммов микроорганизмов к 14 антибиотикам, не отличающиеся от таковых на контрольной среде надёжного производителя — МХБ-BD.

Выпускаемый бульон может быть использован для рутинного выполнения метода серийных разведений в макро- и микровариантах исполнения, для коммерческих тестов (в формате планшетов и МПК-стрипов с высушенными субстанциями антибиотиков), а также для автоматических анализаторов.

Заключение

На разработанном отечественном МХБ-Оболенск получены антибиотикограммы для клинических штаммов, которые не отличались от антибиотикограмм на среде сравнения. Бульон соответствует требованиям национальных и международных стандартов, и с помощью него можно тестировать в том числе актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Информация об авторах

Косилова Ирина Сергеевна[✉] — к. б. н., н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, kosilova.irina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>

Домотенко Любовь Викторовна — к. х. н., в. н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Храмов Михаил Владимирович — к. м. н., зам. директора по качеству и развитию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Участие авторов: Косилова И.С. — проведение экспериментов, анализ и обобщение полученных данных, работа с источниками литературы, статистическая обработка материала, написание текста статьи; Домотенко Л.В. — концепция и дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, работа с источниками литературы, написание текста статьи; Храмов М.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 16.08.2024;
принята к публикации 25.10.2024;
опубликована 30.12.2024

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Qadri H., Shah A.H., Mir M. Novel strategies to combat the emerging drug resistance in human pathogenic microbes. *Curr. Drug Targets*. 2021;22(12):1424–36. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450121666201228123212>
2. Тимошевский А.А. *Инфекционная безопасность в медицинской организации. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП)*. М.;2023. Timoshevskii A.A. *Infection Safety in a Medical Organization. Infections Associated with Healthcare (IAH)*. Moscow;2023.
3. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
4. Mirzaei R., Goodarzi P., Asadi M., et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*. 2020;72(10):2097–111. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.2356>
5. Bohlmann L., De Oliveira D.M.P., El-Deeb I.M., et al. Chemical synergy between ionophore PBT2 and zinc re-verses antibiotic resistance. *mBio*. 2018;9(6):e02391-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02391-18>
6. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., et al. Effect of manganese in test media on *in vitro* susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(9):3077–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01485-12>
7. Barry A.L., Roller L.B., Miller G.H. Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller–Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(3):585–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.585-589.1992>
8. Von A.U., Wirz D., Daniels A.U. Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 2009;9:106. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-106>

Information about the authors

Irina S. Kosilova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, kosilova.irina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>

Lyubov V. Domotenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Mikhail V. Khramov — Cand. Sci. (Med.), Deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Author contribution: Kosilova I.S. — conducting experiments, analyzing and summarizing the data obtained, working with literature sources, statistical processing of the material, writing the text of the article; Domotenko L.V. — concept and design of the study, collecting material, statistical processing of the material, working with literature sources, writing the text of the article; Khramov M.V. — concept and design of the study, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 16.08.2024;
accepted for publication 25.10.2024;
published 30.12.2024