

2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Том 102
2025

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

2

MARCH—APRIL
VOLUME 102
2025

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.

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

**ТОМ 102
2025**

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://nporemp.ru>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pccr.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 29.04.2025.
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

Ответственный секретарь

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

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. Иванова Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Исакова-Сивак И.Н., д.б.н., член-корр. РАН, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 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 Vopengame, 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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Есьман Анна Сергеевна, к. м. н., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия

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

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

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2025

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.

2

MARCH – APRIL

VOLUME 102

2025

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://npoopmp.ru>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.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 April 29, 2025.

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 Secretary

Alexander E. Platonov, Professor, 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

Irina N. Isakova-Sivak, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Biology), Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 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. Kutnyrev, 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 Bopagama, 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

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

Inna S. Esman, Cand. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, D. Sci. (Medicine), M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

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

- Гребенникова Т.В., Зайкова О.Н., Плотников А.А., Костина Л.В., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Лосич М.А., Кириллов И.М., Филатов И.Е., Баландина М.В., Цибезов В.В., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Кондратьева В.М., Козлова А.А., Баранец М.С., Гинцбург А.Л.**
Исследование безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики COVID-19 на основе вирусоподобных частиц в рамках I фазы клинических испытаний* 135
- Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С., Гапонова И.И., Миронов К.О.**
Молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом* 150
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Зайцев А.Е.**
Гуморальный иммунитет к адгезинам и токсинам возбудителя коклюша у мышей, иммунизированных экспериментальными бесклеточными коклюшными вакцинами из биоплёночной и планктонной культур *Bordetella pertussis** 162
- Абрамова С.А., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Лубова В.А., Мерлов Е.К., Белов Ю.А., Сомова Л.М., Щелканов М.Ю.**
Динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка, заражённых SARS-CoV-2 *ex vivo** 168
- Утенкова Е.О., Княжев И.С., Щур Н.С.**
Прогнозирование заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом с использованием методов математического моделирования (на примере Кировской области)* 179
- Клюева С.Н., Буданова А.А., Краецов А.Л., Бугоркова С.А.**
Перспектива применения биофлуоресцентных белков на этапе доклинической оценки живых вакцин на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTURBOGFP-B* 190
- Васильева О.В., Ульшина Д.В., Волынкина А.С., Писаренко С.В., Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Яценко Н.А., Куличенко А.Н.**
Опыт применения метода метагеномного секвенирования по фрагментам гена *16S rRNA* для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций* 201
- Бондаренко Е.В., Ермолаева Е.А., Холодилов И.С., Литов А.Г.**
Получение и очистка рекомбинантных белков VP2 и VP3 вируса *Alongshan* группы *Jingmenvirus* и оценка их иммунохимических свойств* 213

НАУКА И ПРАКТИКА

- Суворов А.Н., Цапиева А.Н., Чернов А.Н.**
Эфektorные молекулы стрептококков как перспективные противоопухолевые средства: плюсы и минусы* 223

ОБЗОРЫ

- Котомина Т.С.**
Современное состояние разработок в области создания вакцин против респираторно-синцитиального вируса* 239

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Grebennikova T.V., Zaykova O.N., Plotnikov A.A., Kostina L.V., Chernoryzh Ya.Yu., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Larichev V.F., Fedyakina I.T., Losich M.A., Kirillov I.M., Filatov I.E., Balandina M.V., Tsibezov V.V., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Kondratieva V.M., Kozlova A.A., Baranets M.S., Gintsburg A.L. A study of the safety and immunogenicity of a new vaccine for the prevention of COVID-19 based on virus-like particles in phase I clinical trials*	135
Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kuzmenkov A.Yu., Kozlov R.S., Gaponova I.I., Mironov K.O. Molecular and biological characterization of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates from patients with pneumococcal meningitis*	150
Zaitsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Zaitsev A.E. Humoral immunity to adhesins and toxins of the pertussis pathogen in mice immunized with experimental acellular pertussis vaccines from biofilm and planktonic cultures of <i>Bordetella pertussis</i> *	162
Abramova S.A., Lyapun I.N., Drobot E.I., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Lubova V.A., Merlov E.K., Belov I.A., Somova L.M., Shchelkanov M.Yu. Dynamics of enzymatic activity in primary culture of Syrian hamster adherent leukocytes <i>ex vivo</i> infected with SARS-CoV-2*	168
Utenkova E.O., Knyazhev I.S., Shchur N.S. Prediction of the incidence of Lyme disease using mathematical modeling methods (using the example of the Kirov region)*	179
Klyueva S.N., Budanova A.A., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. Possibilities and prospects of using biofluorescent proteins at the stage of preclinical evaluation of live vaccines, using the example of the <i>Yersinia pestis</i> vaccine strain EV NIEG pTURBOGFP-B*	190
Vasilieva O.V., Ul'shina D.V., Volynkina A.S., Pisarenko S.V., Siritsa Yu.V., Gnusareva O.A., Yatsenko N.A., Kulichenko A.N. Experience of applying the metagenomic sequencing method on fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of natural focal infection pathogens*	201
Bondarenko E.V., Ermolaeva E.A., Kholodilov I.S., Litov A.G. Production and purification of recombinant proteins VP2 and VP3 of the <i>Alongshan</i> virus of the <i>Jingmenvirus</i> group and evaluation of their immunochemical properties*	213
SCIENCE AND PRACTICE	
Suvorov A.N., Tsapieva A.N., Chernov A.N. Streptococcal effective molecules as promising anticancer agents: <i>pros</i> and <i>cons</i> *	223
REVIEWS	
Kotomina T.S. Current status of developments in the field of respiratory syncytial virus vaccines*	239

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-661>



Исследование безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики COVID-19 на основе вирусоподобных частиц в рамках I фазы клинических испытаний

Гребенникова Т.В.[✉], Зайкова О.Н., Плотников А.А., Костина Л.В., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Лосич М.А., Кириллов И.М., Филатов И.Е., Баландина М.В., Цибезов В.В., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Кондратьева В.М., Козлова А.А., Баранец М.С., Гинцбург А.Л.

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

Аннотация

Введение. Одним из перспективных направлений в предупреждении распространения инфекций, в том числе COVID-19, является получение вакцин на основе вирусоподобных частиц (virus like particles, VLP). В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана вакцина на основе VLP против COVID-19.

Цель работы — оценить переносимость, безопасность и иммуногенность новой вакцины для профилактики COVID-19 на основе VLP в сравнении с плацебо на протяжении 21 сут после двукратного внутримышечного введения в рамках I фазы клинических испытаний.

Материалы и методы. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование переносимости, безопасности, и иммуногенности вакцины для профилактики COVID-19 на основе VLP проводили с дозой введения препарата, содержащего 40 и 80 мкг антигена, плацебо — 0,9% NaCl. У 180 добровольцев в возрасте 18–55 лет отмечали наличие или отсутствие нежелательных явлений (НЯ) после вакцинации, оценивали показатели крови, напряжённость гуморального и клеточного иммунитета до и после вакцинации с помощью иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации, реакции бласттрансформации лимфоцитов и проточной цитометрии.

Результаты. Анализ переносимости и безопасности новой вакцины против COVID-19 на основе VLP показал, что большинство НЯ регистрировались в течение первых 10 сут после вакцинации, преимущественно после 1-й вакцинации. В период с 11-х по 21-е сутки после вакцинации НЯ отмечались в единичных случаях. Летальных исходов, серьёзных и иных НЯ не зарегистрировано. Введение исследуемой вакцины добровольцам не оказало негативного влияния на основные жизненные показатели. Сравнительная характеристика показателей иммуногенности у добровольцев показала, что введение вакцины с содержанием антигена как 40, так и 80 мкг приводит к выраженному и достоверному росту уровня специфических иммуноглобулинов, вируснейтрализующих антител и активации клеточно-опосредованного иммунного ответа. В рамках I этапа клинических исследований доза 80 мкг была выбрана как оптимальная.

Заключение. Новая вакцина для профилактики COVID-19 на основе VLP с содержанием антигена 40 и 80 мкг при введении добровольцам внутримышечно не вызывает серьёзных НЯ и индуцирует напряжённый гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вирусоподобные частицы, вирусоподобные частицы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен на заседании Совета по этике Департамента регулирования обращения лекарственных средств и медицинских изделий Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ 310 от 31.05.2022).

Благодарность. Авторы статьи выражают благодарность за сотрудничество ООО «РИК-Фарма», ГБУЗ МО «Электростальская центральная городская больница», ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой» РАН.

Источник финансирования. Государственное задание Министерства здравоохранения Российской Федерации 121092400113-8 «Клинические испытания вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19 (1–2 фазы)».

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

Для цитирования: Гребенникова Т.В., Зайкова О.Н., Плотников А.А., Костина Л.В., Чернорыж Я.Ю., Елисева О.В., Латышев О.Е., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Лосич М.А., Кириллов И.М., Филатов И.Е., Баландина М.В., Цибезов В.В., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Кондратьева В.М., Козлова А.А., Баранец М.С., Гинцбург А.Л. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики COVID-19 на основе вирусоподобных частиц в рамках I фазы клинических испытаний. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):135–149.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-661>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-661>

A study of the safety and immunogenicity of a new vaccine for the prevention of COVID-19 based on virus-like particles in phase I clinical trials

Tatiana V. Grebennikova[✉], Olga N. Zaykova, Alexey A. Plotnikov, Lyudmila V. Kostina, Yana Yu. Chernoryzh, Olesia V. Eliseeva, Oleg E. Latyshev, Viktor F. Larichev, Irina T. Fedyakina, Milana A. Losich, Ilya M. Kirillov, Ilya E. Filatov, Marina V. Balandina, Valery V. Tsibezov, Kirill I. Yurlov, Ekaterina I. Lesnova, Valeria M. Kondratieva, Alina A. Kozlova, Marina S. Baranets, Aleksandr L. Gintsburg

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. One of the more promising developments in preventing the spread of infections, including COVID-19, is the production of vaccines based on virus-like particles (VLP). Currently, in the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russia has developed a VLP-based vaccine against COVID-19.

The aim of this study is to evaluate the tolerability, safety and immunogenicity of a new vaccine for the prevention of COVID-19 based on VLP compared with placebo for 21 days after two intramuscular injections in phase I clinical trials.

Materials and methods. A double-blind, placebo-controlled study of the tolerability, safety and immunogenicity of a vaccine for the prevention of COVID-19 based on VLP was conducted with a dose of the drug containing 40 and 80 micrograms of antigen, the placebo being 0.9% NaCl. The presence or absence of adverse events (AEs) after vaccination was noted in 180 volunteers aged 18 to 55 years; clinical and biochemical blood parameters, the intensity of humoral and cellular immunity before and after vaccination were assessed using enzyme immunoassay, neutralization reactions, lymphocyte blast transformation reactions and flow cytometry.

Results. An analysis of the tolerability and safety of the new COVID-19 VLP-vaccine showed that most adverse events were registered within the first 10 days after vaccination, mainly after the first vaccination. In the period from 11 to 21 days after vaccination, AEs were observed in isolated cases. No deaths, serious or other AEs have been reported. The administration of the studied vaccine to the volunteers had no negative effect on the basic vital signs. A comparative analysis of immunogenicity indicators in volunteers showed that the administration of a vaccine with both an antigen content of 40 µg and an antigen content of 80 µg leads to a pronounced and significant increase in the level of specific immunoglobulins, virus neutralizing antibodies and activation of a cell-mediated immune response. As part of the phase I clinical trials, a dose of 80 µg was selected as optimal.

Conclusion. It has been shown that a new vaccine for the prevention of COVID-19 based on VLP with an antigen content of 40 and 80 µg when administered intramuscularly to volunteers does not cause serious adverse events and induces a tense humoral and cellular immune response.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, virus-like particles, VLP

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The study protocol was approved at a meeting of the Ethics Council of the Department of Regulation of the Circulation of Medicines and Medical Devices of the Ministry of Health of the Russian Federation (No. 310, dated 05.31.2022).

Acknowledgement. The authors of the article express their gratitude for the cooperation of RIC-Pharma, Elektrostal City Hospital, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences

Funding source. State assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation 121092400113-8 «Clinical trials of a VLP-based vaccine for the prevention of COVID-19 (phases 1-2)».

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

For citation: Grebennikova T.V., Zaykova O.N., Plotnikov A.A., Kostina L.V., Chernoryzh Ya.Yu., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Larichev V.F., Fedyakina I.T., Losich M.A., Kirillov I.M., Filatov I.E., Balandina M.V., Tsibezov V.V., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Kondratieva V.M., Kozlova A.A., Baranets M.S., Gintsburg A.L. A study of the safety and immunogenicity of a new vaccine for the prevention of COVID-19 based on virus-like particles in phase I clinical trials. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):135–149.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-661>
EDN: <https://www.elibrary.ru/LKOJHI>

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции поставила перед службами здравоохранения всего мира серьёзные задачи по профилактике, терапии и диагностике данного заболевания. COVID-19 — тяжёлая острая респираторная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae*, *Orthocoronavirinae*, *Betacoronavirus*, *Sarbecovirus*), характеризуется высокой летальностью, которая, по данным разных исследований, колеблется от 0,5 до 15% [1–3].

Первые случаи заболевания, обусловленного вирусом SARS-CoV-2, были зарегистрированы в декабре 2019 г. в Китае. Вирус достаточно быстро распространился на все континенты, и, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на декабрь 2021 г. в мире было зарегистрировано более 260 млн подтверждённых случаев заболевания COVID-19, в том числе 5,2 млн смертельных исходов¹.

Наиболее тяжёлые проявления коронавирусной инфекции — интерстициальная пневмония с нарушением дыхательной функции и полиорганная недостаточность, которые часто становились причиной смертельного исхода [4–6]. Длительность постинфекционного иммунитета до конца не изучена [7].

По данным Роспотребнадзора, на 12.05.2024 в мире выявлено около 785 млн случаев, наиболее неблагоприятен Западно-Тихоокеанский регион. В России с 02.03.2020 по 05.05.2024 было зарегистрировано порядка 24 млн случаев заболевания в 85 субъектах². Несмотря на заявления ВОЗ, что COVID-19 перешёл в разряд сезонных инфекций и периодически вызывает вспышки заболевания наряду с гриппом и острыми респираторными вирусными заболеваниями, вирус SARS-CoV-2

продолжает инфицировать людей и уносить их жизни³.

Изменчивость SARS-CoV-2, а именно мутации в рецептор-связывающем домене (receptor binding domain, RBD) S-белка, привели к появлению в мире разнообразия вариантов вируса, из которых наиболее эпидемически значимы и вызывают озабоченность ВОЗ на данный момент Alpha (линия B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) [8]. Появление новых вариантов вируса, в том числе имеющих пониженную чувствительность к вируснейтрализующим антителам и вакцинации уже имеющимися вакцинами, требует проведения регулярного молекулярно-генетического мониторинга SARS-CoV-2 и разработки новых высокоэффективных вакцин, способствующих формированию напряжённого и длительного иммунитета в отношении актуальных штаммов возбудителя коронавирусной инфекции [8].

Эффективная вакцина против COVID-19 должна быть безопасной, ареактогенной и индуцировать образование вируснейтрализующих антител в титрах, достаточных для предотвращения развития инфекционного процесса. Кроме того, вакцина должна способствовать формированию эффективного иммунного ответа при наименьшем количестве используемого антигена. Это снижает стоимость вакцины и делает её доступной [9].

В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана вакцина на основе вирусоподобных частиц (virus like particle, VLP) для профилактики COVID-19. VLP сформированы из 4 рекомбинантных структурных белков (S, M, E, N) и схожи по строению с вирионом SARS-CoV-2, но без вирусной РНК. Поверхностный S-белок (S-spike) SARS-CoV-2 является ответственным за связывание со специфическими рецепторами на поверхности чувствительных клеток. В составе вакцины используются частицы, содержащие S-белок с консенсусными мутациями кладов 19A, Delta и Omicron. Таким образом, предполагается, что после иммунизации в организме будут синтезироваться антитела к штаммам данных кладов.

Структурные шиповидный и мембранный белки претерпевают значительные мутационные изменения, в то время как белки оболочки и нуклеокапсида являются высококонсервативными, что

¹ WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. 11 March 2020. URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
WHO. COVID-19 Epidemiological Update. 06.11.2024.
URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/covid-19_epi_update_173.pdf?sfvrsn=457952e6_4&download=true

² Эпидемиологическая обстановка и распространение COVID-19 в мире по состоянию на 8 мск от 12.05.2024 г. ФКУН РосНИПЧИ «Микроб». Федеральная служба по защите прав потребителей и благополучия человека.
URL: <https://www.rospotrebnadzor.ru/12.05.2024%20г.%20Информация%20о%20случаях%20заболевания.docx>

³ Число подтвержденных случаев COVID-19, зарегистрированных в ВОЗ/WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard.
URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>

указывает на дифференциальное давление отбора, которому подвергался SARS-CoV-2 в ходе эволюции. При этом вклад вирусных белков М, Е, N в формирование В- и Т-клеточного иммунитета не менее важен, что подтверждается разработкой вакцин на основе этих белков [10, 11]. Было показано, что разрабатываемая вакцина уже после 1-й иммунизации стимулирует Т-клеточный иммунный ответ у золотистых хомячков, который также обеспечивает защиту против различных штаммов SARS-CoV-2 [12].

Данные о доклинических испытаниях препарата были представлены в Министерство здравоохранения РФ. Получено разрешение на проведение клинических исследований от 16.02.2022 № 115.

Целью данной работы была оценка переносимости, безопасности и иммуногенности новой вакцины для профилактики COVID-19 на основе VLP в сравнении с плацебо на протяжении 21 сут после двукратного внутримышечного введения в рамках I фазы клинических испытаний.

Задачи исследования:

1. Оценить последовательно переносимость и безопасность вакцины с содержанием дозы антигена 40 и 80 мкг, вводимых внутримышечно на 10-е сутки после однократной вакцинации.

2. Оценить переносимость и безопасность вакцины с содержанием дозы антигена 40 и 80 мкг, вводимых внутримышечно на 21-е сутки после двукратной вакцинации.

3. Оценить иммуногенность вакцины с содержанием дозы антигена 40 и 80 мкг, вводимых внутримышечно на 21-е сутки после двукратной вакцинации.

4. Определить оптимальную дозировку вакцины на основании полученных показателей иммуногенности и безопасности для изучения в рамках II фазы клинического исследования.

Материалы и методы

Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое многоцентровое проспективное исследование I фазы клинических исследований с ранжированием доз для оценки переносимости, безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики COVID-19 на основе VLP (содержащей частицы, подобные SARS-CoV-2) при внутримышечном введении на добровольцах в возрасте 18–55 лет проводилось с февраля по декабрь 2022 г. на базе 2 исследовательских центров: ГБУЗ МО «Электростальская центральная городская больница» и ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой» РАН в соответствии с принципами Хельсинской декларации (2013 г.), руководством ICH по Надлежащей клинической практике (версия E6, одобренная CPMP/135/95), Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Приказом Министерства здра-

воохранения РФ от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики»; Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», утвержденным Приказом Федерального агентства по техническому урегулированию и метрологии № 497-ст. от 04.06.2014, Правилами надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза», утвержденными Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 79 и другими применимыми требованиями национального законодательства.

До включения в исследование добровольцы были ознакомлены с информацией об исследовании и подписали форму информированного согласия. Исследователи, привлеченные к участию в клиническом исследовании, до его начала предоставляли подписанные и датированные резюме, содержащие описание научной деятельности, и сертификаты, подтверждающие квалификацию.

В исследование были включены 180 добровольцев мужского и женского пола в возрасте 18–55 лет. Все добровольцы были здоровыми, соответствовали критериям включения (см. **Приложение 1** на сайте журнала) и были разделены на 3 группы:

- 1-я группа — 60 добровольцев, которые были привиты вакциной с содержанием антигена 40 мкг двукратно с интервалом 21 сут внутримышечно;
- 2-я группа — 60 добровольцев, которые были привиты вакциной с содержанием антигена 80 мкг двукратно с интервалом 21 сут внутримышечно;
- 3-я группа — 60 добровольцев, которые получили плацебо двукратно с интервалом 21 сут внутримышечно.

Вакцина представляла собой очищенные рекомбинантные вирусоподобные частицы SARS-CoV-2, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии. Поверхностный белок S в составе вирусоподобных частиц представлен вариантами 19A, Alpha, Delta и Omicron. В состав вакцины входил адъювант на основе сквалена. Объёмное соотношение адъюванта и антигена составляло 1 : 1. Исследовали вакцину с содержанием антигена 40 и 80 мкг. В качестве плацебо использовали 0,9% раствор NaCl.

Добровольцев обследовали во время визитов:

- визит 1 (госпитализация, рандомизация, 1-я вакцинация);
- визиты 2, 3 (2–3-и сутки после 1-й вакцинации);
- визит 4 (10-е сутки после 1-й вакцинации);
- визит 5 (21-е сутки после 1-й вакцинации, госпитализация, 2-я вакцинация);
- визиты 6, 7 (2–3-и сутки после 2-й вакцинации);

- визит 8 (10-е сутки после 2-й вакцинации);
- визит 9 (21-е сутки после 2-й вакцинации).

Проводили анализ данных электронного дневника самонаблюдения, физикальное обследование, оценку витальных показателей, сбор данных по сопутствующей терапии, выявление и регистрацию нежелательных явлений (НЯ) и серьёзных НЯ, оценку критериев включения/невключения. Отбирали кровь для оценки клеточного и гуморального иммунитета. Проводили биохимический, клинический анализы, определение общего IgE, коагулограммы, общий анализ мочи. Во время визитов 4, 5, 8, 9 отбирали носоглоточные мазки для определения отсутствия РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Критерии оценки переносимости, безопасности и иммуногенности указаны в **Приложении 2** на сайте журнала.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Отбирали кровь на 10-е сутки после 1-й и 2-й вакцинаций (визиты 4 и 8). Фракции мононуклеарных клеток из периферической крови выделяли путём центрифугирования на одноступенчатом градиенте плотности фиколл-пака («ПанЭко»), выделенные мононуклеары отмывали дважды в чистой среде RPMI-1640 и высевали в 96-луночные планшеты для микрокультивирования в концентрации 10^5 клеток/луночку и добавляли стимуляторы в 100 мкл до конечных концентраций. В качестве отрицательного контроля мы использовали только среду (спонтанная пролиферация); неспецифического положительного контроля — митоген конканавалин А (5 мкг/мл, «ПанЭко»), специфического стимулятора — вирус SARS-CoV-2: PMVL-12, номер депонирования EPI_ISL_572398 в базе Gisaid; неспецифического стимулятора — антиген Конго-крымской геморрагической лихорадки, а также адьювант Seppic. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональную телячью сыворотку, 2 мМ глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ЕД/мл инсулина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Все манипуляции выполняли в стерильных условиях.

Пролиферацию спленоцитов оценивали в РБТЛ через 4 сут с помощью инвертированного микроскопа ($\times 400$). Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП), рассчитанного как отношение среднего числа лимфобластов, наблюдаемых в присутствии и в отсутствие специфических стимуляторов. Положительным считали результат, если ИСП > 2.

Полученные данные обрабатывали с помощью программ «Prizm Graphpad v. 8.4.3» («GraphPad Software»). Статистический анализ проводили с помощью программы «Statistica v. 12.6» («StatSoft Inc.»). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Статистически значимым считали значение $p < 0,05$.

Окраска клеток для проточной цитометрии. 1 млн лимфоцитов в объёме 50 мкл вносили в центрифужные пробирки и добавляли по 5 мкл моноклональных антител анти-CD3, анти-CD4 и анти-CD8 («Сорбент») и инкубировали 45 мин при 4°C. Дважды отмывали в растворе Хенкса (5 мин при 200g). Удаляли супернатант, клетки суспендировали в 200 мкл раствора Хенкса и анализировали на проточном цитометре «BD FACS Accuri C6+». Полученные данные обрабатывали с помощью программ «Cytotflex» и «Prizm Graphpad 8.0». Результаты анализировали с помощью программы «FlowJo» («Three Star»).

Оценку гуморального иммунитета проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН). Отбирали кровь на 10-е сутки после 1-й и 2-й вакцинации (визиты 5 и 9). ИФА проводили набором реагентов для иммуноферментного выявления IgG к RBD поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 («SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», РУ № РЗН 2020/10393).

Уровни нейтрализующих антител определяли путём титрования сывороток крови с 1 : 10 до 1 : 1280 против 100 ТЦИД₅₀ трёх штаммов SARS-CoV-2 из коллекции лаборатории молекулярной диагностики: Wuhan, Delta (линия B.1.617.2) и Omicron (вариант XBB 1.5). Реакцию нейтрализации проводили микрометодом в 96-луночных планшетах на перевиваемой культуре клеток почки зелёной мартышки Vero E6. Разведения сывороток инкубировали с вирусами в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и переносили в планшет с монослоем клеток. Через 72 ч учитывали реакцию по наличию цитопатического действия вируса. Титром сыворотки (последним нейтрализующим разведением) считали разведение, при котором обеспечивается 100% защита клеток (нет цитопатического действия).

Измерение концентрации цитокинов в сыворотках проводили методом ИФА с помощью коммерческих тест-систем («Вектор-Бест»): набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-2 в сыворотке крови «Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ»; набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ»; набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ».

Статистическую обработку данных проводили с помощью «Microsoft Office Excel 2007–2016» и статистических онлайн-калькуляторов (<https://math.semestr.ru>, <https://medstatistic.ru>). В качестве описательных характеристик показателей демографических и иных исходных данных, а также параме-

тров безопасности и показателей иммуногенности использовали средние, стандартные отклонения, квартили, минимальные и максимальные величины, а также частоты, в зависимости от характера данных.

Для анализа количественных показателей в динамике в каждой группе использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями или анализ Фридмана, в зависимости от характера распределения данных. Для апостериорных сравнений значений на скрининге с последующими визитами применяли критерий Даннета в случае дисперсионного анализа и критерий Данна с поправкой Бонферрони в случае анализа Фридмана.

Сравнения групп между собой по качественным признакам проводили с помощью критерия χ^2 или точного теста Фишера. Средние геометрические значения титров (СГТ) для каждой исследуемой группы с 95% доверительными интервалами (ДИ) оценены для каждой временной точки. Для анализа титров к исходным данным применена логарифмическая трансформация. Для сравнений исследуемых групп между собой к логарифмированным данным применяли дисперсионный анализ (апостериорные сравнения по методу Бонферрони или Геймса–Хоуэлла, если дисперсии не равны) или анализ Краскела–Уоллиса (апостериорные сравнения по методу Данна с поправкой Бонферрони) в зависимости от характера распределения. Для оценки вида распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова, а также показатели асимметрии и эксцесса.

Для проверки гомогенности дисперсий применяли критерий Левена, для оценки связи между титрами нейтрализующих и специфических антител — корреляцию Спирмена. Для коэффициента корреляции рассчитан 95% ДИ. В качестве описательных характеристик для параметров эффективности приведены частоты с 95% ДИ, рассчитанные по методу Клоппера–Пирсона.

Результаты

В ходе исследования безопасности и иммуногенности новой вакцины для профилактики COVID-19 на основе VLP в рамках I фазы клинических испытаний добровольцы, прошедшие скрининг ($n = 180$; 107 мужчин и 73 женщины), были распределены на 3 группы, при этом закончили исследование 84% ($n = 151$: в 1-й группе — 52,

во 2-й — 53, в 3-й — 46). Демографические данные представлены в **табл. 1**.

Оценка переносимости и безопасности вакцины

В **Приложении 3** на сайте журнала представлены все НЯ по группам. За весь период поствакцинального наблюдения в течение 21 сут после двукратной вакцинации выявлено 572 НЯ у 138 (76,7%) добровольцев, из них в 1-й группе отмечалось 216 НЯ у 47 (78,3%) добровольцев, во 2-й — 226 НЯ у 49 (81,7%) добровольцев, в 3-й — 130 НЯ у 42 (70%) добровольцев (**рис. 1**). У одного и того же добровольца могло встречаться несколько реакций одновременно.

Чаще всего, в 50,5% случаях, добровольцы отмечали общие нарушения и реакции в месте введения (в 37,7% — боль в месте вакцинации и в 22,5% — усталость), которые в 95% случаев наблюдались в первые 10 сут. Также в 20,5% случаев отмечались клинически значимые отклонения в лабораторных анализах в равной степени как на 10-е, так и на 21-е сутки после введения исследуемого препарата, вне зависимости от вакцинации. В 64,5% случаев зарегистрированные НЯ имели лёгкую степень тяжести, в 31,1% — среднюю, в 4,4% — тяжёлую. В большинстве случаев взаимосвязь развития НЯ с вакцинацией была расценена как «вероятная». В 95% случаях всех НЯ исходом стало «выздоровление без последствий», в 5% — «ещё не выздоровел». Летальных исходов, серьёзных НЯ и других значимых НЯ, которые были расценены как имеющие особый интерес вследствие их клинической значимости, не зарегистрировано.

Результаты лабораторных исследований подтвердили, что введение исследуемой вакцины добровольцам в возрасте 18–55 лет не оказывает негативного влияния на основные показатели клинического и биохимического анализов крови, уровень IgE и показатели общего анализа мочи. Отклонения лабораторных показателей от нормы регистрировались во всех группах. При этом большинство отклонений были расценены как клинически незначимые. Наибольшее количество клинически значимых отклонений отмечалось по показателям уровня креатинфосфокиназы и IgE. Результаты электрокардиографического исследования до начала и после завершения применения препаратов позволяют сделать вывод об отсутствии влияния введения исследуемых вакцин на работу сердечной мышцы, все

Таблица 1. Демографические данные пациентов, $M \pm SD$

Группа	n	Возраст, лет	Рост, см	Масса тела, кг	Индекс массы тела, кг/м ²
Все субъекты исследования	180	29,91 ± 10,36	171,82 ± 8,21	68,02 ± 10,58	22,94 ± 2,50
1-я группа	60	31,62 ± 12,00	172,18 ± 8,50	67,94 ± 9,76	22,84 ± 2,22
2-я группа	60	26,58 ± 7,74	172,05 ± 8,82	66,97 ± 11,33	22,49 ± 2,55
3-я группа (плацебо)	60	31,53 ± 10,25	171,22 ± 7,32	69,16 ± 10,66	23,49 ± 2,65

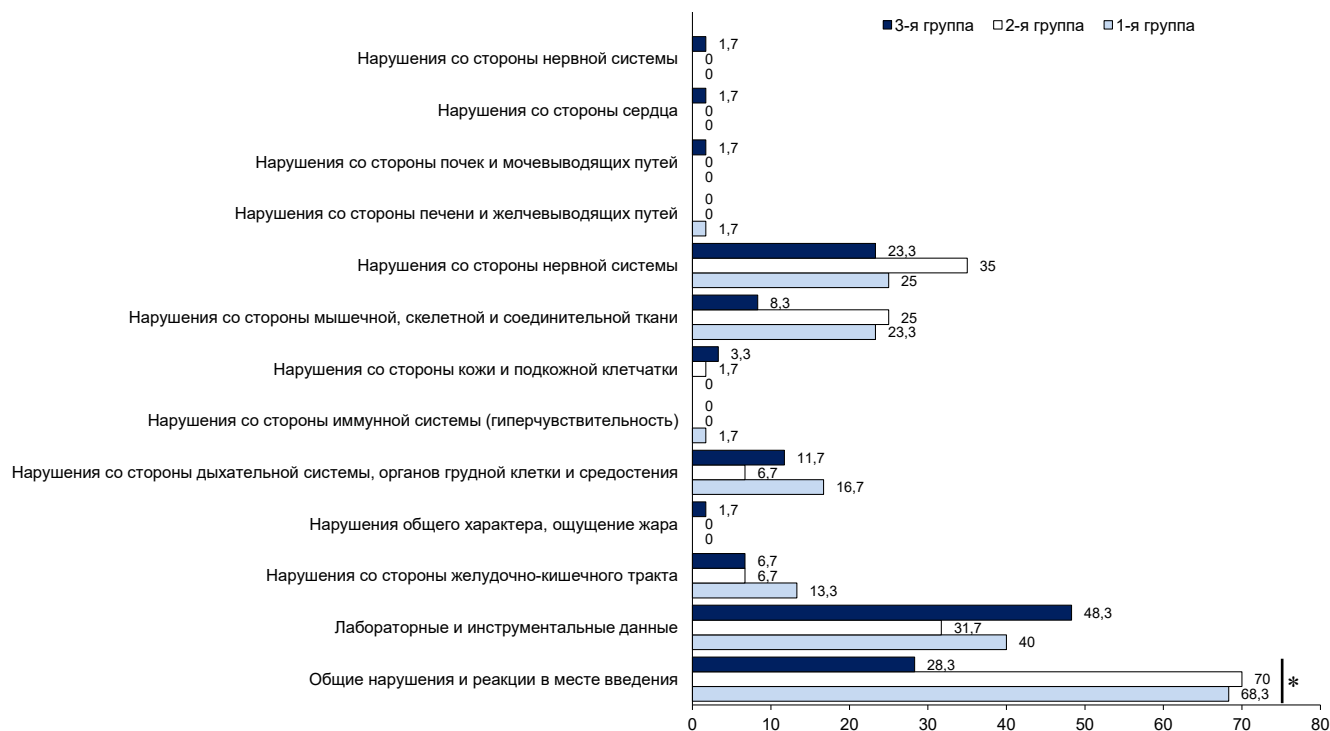


Рис. 1. Доля добровольцев с НЯ по классам систем органов.

* — статистически значимые различия.

результаты находились в пределах нормы. Также не выявлено развития неврологических нарушений, связанных с вакцинацией, у привитых добровольцев. Физикальный осмотр добровольцев, проведённый перед вакцинацией и при каждом визите, не выявил отклонений в состоянии здоровья привитых ни в одной из групп, за исключением случаев, связанных с проявлениями НЯ.

Исследование гуморального иммунного ответа в реакции нейтрализации

На скрининге в исследовательских центрах у всех добровольцев при экспресс-тестировании на COVID-19 были получены отрицательные результаты, однако в реакции ИФА и РН отмечалось

наличие антител. В группе плацебо значения СГТ колебались незначительно, а в 1-й и 2-й группах наблюдали рост СГТ в отношении штаммов Wuhan, Delta и Omicron (рис. 2).

У добровольцев с низким СГТ ($\leq 1/80$) до вакцинации в РН после вакцинации наблюдали значительный прирост антител (рис. 3). При наличии высоких титров ($> 1/80$) в РН отмечались более низкие показатели иммуногенности. В 3-й группе нарастающие титры антител практически не отмечались.

Исследование гуморального иммунного ответа методом ИФА

При исследовании гуморального иммунного ответа в динамике методом ИФА показано, что

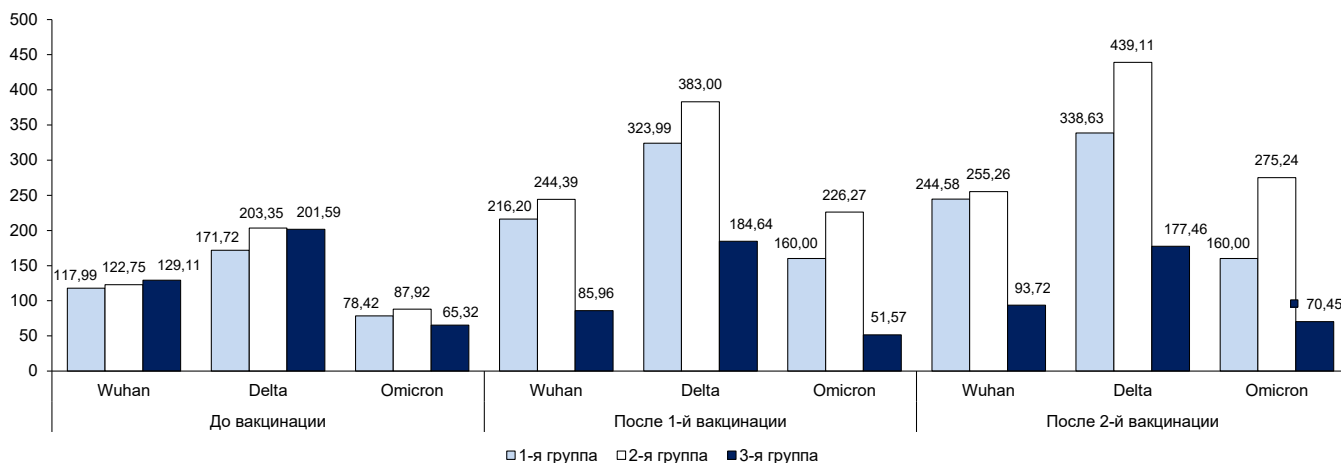


Рис. 2. СГТ нейтрализующих антител у всех добровольцев.

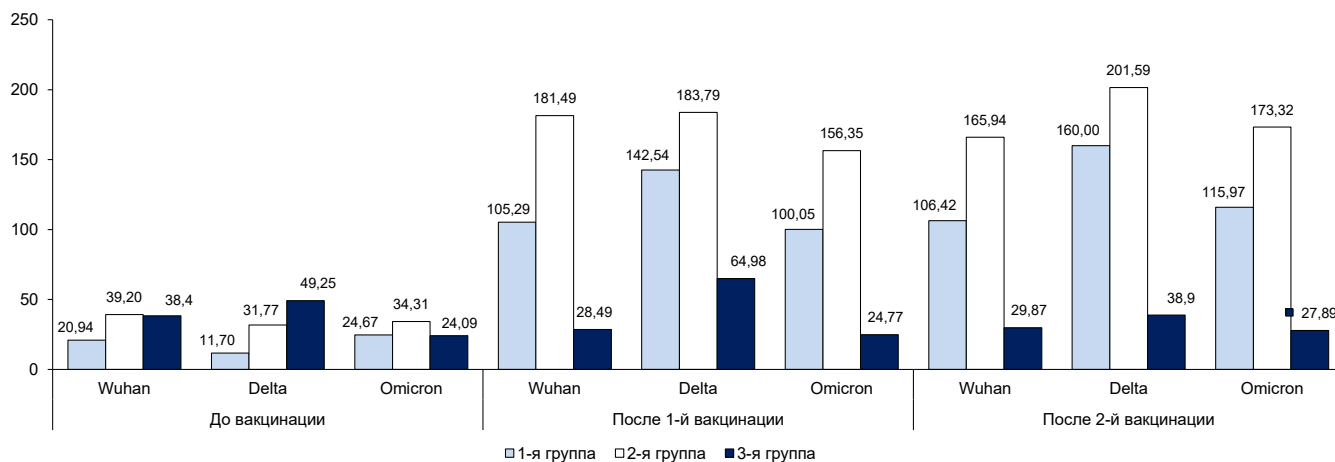


Рис. 3. СГТ нейтрализующих антител у добровольцев с исходно низким титром антител ($\leq 1/80$).

в 1-й группе нарастание титров IgG к S-белку SARS-CoV-2 на 21-е сутки после однократного введения отмечалось у 100% добровольцев, после 4-кратного — у 70%, СГТ составил 1600, а на 21-е сутки после 2-кратного введения СГТ уже составлял 2177,26, уровень сероконверсии — 77,8% (рис. 4). Во 2-й группе на 21-е сутки после однократного введения вакцины нарастание титров IgG отмечалось у 100% добровольцев, после 4-кратного — у 86%, СГТ составил 4306,88. После 2-го введения вакцины с содержанием антигена 80 мкг показатели иммуногенности практически не менялись. В 3-й группе нарастания титров IgG не отмечалось, СГТ оставался на том же уровне. Средние показатели общих IgA, IgM, IgG добровольцев в течение динамического наблюдения претерпевали незначительные изменения во всех группах.

На 21-е сутки после 1-й вакцинации в ИФА у всех добровольцев 1-й группы определялись специфические IgG к S-белку SARS-CoV-2, при этом титры антител составили 1 : 400–1 : 12 800, а показатель СГТ — 4201,57. Доля добровольцев, у которых отмечался прирост титра антител, составила 62,5%, из них с 4-кратной сероконверсией — 19,6%.

На 21-е сутки после 2-й вакцинации показатель СГТ составил 4306,88, а уровень сероконверсии — 20,4%. Кратность прироста СГТ относительно скрининга на 21-е сутки после 1-й вакцинации составила 2,1, после 2-й — 2,2.

Во 2-й группе на 21-е сутки после 1-й вакцинации специфические IgG к S-белку SARS-CoV-2 в ИФА определялись у 100% добровольцев, при этом титры антител составили 1 : 1600–1 : 12 800, показатель СГТ — 4950,94. Доля добровольцев, у которых отмечался прирост титра антител, составила 57,4%, из них с 4-кратной сероконверсией — 14,8%. На 21-е сутки после 2-й вакцинации показатель СГТ составил 5261,46, уровень сероконверсии — 19,6%. Кратность прироста СГТ относительно скрининга на 21-е сутки после 1-й вакцинации составила 1,7, после 2-й вакцинации — 1,8.

В 3-й группе специфические IgG в ИФА на 21-е сутки после 1-го введения плацебо определялись у 91,7% добровольцев, при этом титры антител составили 0–1 : 12 800, показатель СГТ — 1241,36. Доля добровольцев, у которых отмечался прирост антител, составила 18,8%, при этом 4-кратная сероконверсия отмечалась у 10,4%. На 21-е сут-

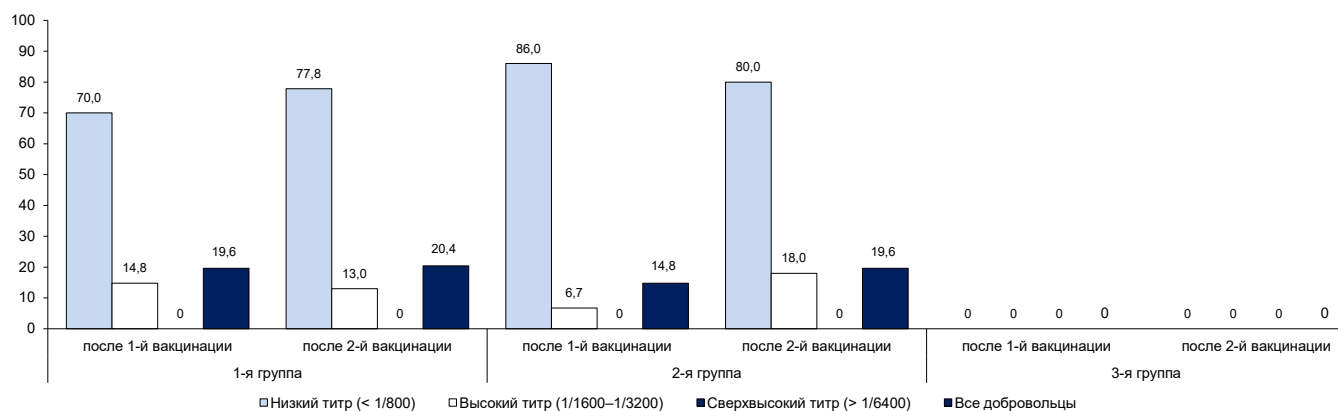


Рис. 4. Показатель уровня сероконверсии на различных сроках исследования.

По оси ординат — доля добровольцев с уровнем сероконверсии (нарастание титра специфических антител ≥ 4 раза), %.

ки после 2-го введения показатель СГТ составлял 2311,60, уровень сероконверсии — 15,9%. При этом методом ПЦР случаи COVID-19 не были выявлены.

Оценка клеточного иммунитета

Исследования проводились исходно (скрининг V), а также на 10-е сутки после 1-й и 2-й вакцинации. При оценке динамики ИСП в результате иммунизации VLP-вакциной отмечалось значимое ($p < 0,05$) увеличение показателя в исследуемых группах по сравнению со скринингом. По мере увеличения числа вакцинаций отмечалось постепенное нарастание клеточного ответа ($p < 0,05$). Средний уровень ИСП достигает максимального значения на 10-е сутки после 2-й иммунизации вакциной, содержащей 40 мкг антигена, в дозе (2,17 [1,87; 3,05]) и вакциной, содержащей 80 мкг антигена, в дозе (2,57 [1,98; 3,17]). В РБТЛ исследовали количество стимулируемых лимфоцитов, и если они стимулируются специфическим стимулятором, то это может говорить о предварительной встрече с антигеном, что возможно либо поствакцинально, либо постинфекционно. В 3-й группе были добровольцы с очень высокими значениями ИСП, что может говорить скорее о постинфекционной стимуляции, т. к. поствакцинально таких высоких уровней ИСП ни при одной из исследуемых доз антигена в вакцине не было. Клеточный и гуморальный иммунный ответ не обязательно коррелируют. У реконвалесцентов COVID-19 нередко наблюдаются ситуации как наличия антител без формирования клеточных реакций, так и отсутствие антител, но при формировании клеточного иммунитета. Поэтому, несмотря на отсутствие сероконверсии в группе добровольцев, иммунизированных плацебо, мы не можем однозначно утверждать об отсут-

ствии бессимптомной инфекции COVID-19 у добровольцев с высоким уровнем ИСП при клеточном ответе. Следует отметить, что такой высокий пролиферативный ответ на специфический антиген в группе плацебо возможен лишь после перенесённой инфекции.

Исследование соотношения CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов не выявило отклонений после вакцинации VLP-вакциной, содержащей как 40, так и 80 мкг антигена в дозе, ни в сторону хелперных, ни в сторону цитотоксических лимфоцитов. Эта дополнительная информация об отсутствии потенциальной иммунотоксичности может наблюдаться после вакцинации (в соответствии с ICH S8) (табл. 2).

Для изучения иммунного статуса у добровольцев также была исследована динамика продукции цитокинов при двукратной иммунизации. Сыворотки у пациентов отбирали до иммунизации и на 10-е сутки после 1-й и 2-й иммунизации (рис. 5).

Анализ статистических различий показал, что в 1-й группе для показателя концентрация фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) отмечалось статистически значимое различие между визитом скрининга (Me = 4,6) и визитом 4 (Me = 7,81). По остальным данным значимых различий не обнаружено.

Полученные результаты показывают, что разработанная VLP-вакцина, содержащая как 40, так и 80 мкг антигена в дозе, может быть индуктором клеточно-опосредованного иммунного ответа, при котором не изменяется соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов ни в сторону хелперных, ни в сторону цитотоксических лимфоцитов. А поствакцинальное изменение уровня цитокинов недостаточно для развития иммунопатологических состояний, связанных с избыточной продукцией исследуемых провоспалительных цитокинов.

Таблица 2. Данные ИСП и соотношений CD4⁺/CD8⁺ в исследуемых группах, Me [Q₁; Q₃]

№	Иммунизация	Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
		<i>n</i>	60	60	60
1	До вакцинации	ИСП	1,40 [1,15; 1,69]	1,43 [1,07; 1,83]	1,25 [1,11; 1,59]
		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,15 [1,71; 2,81]	2,44 [1,77; 2,97]	2,70 [1,97; 3,25]
		<i>n</i>	54	52	49
2	На 10-е сутки после 1-й вакцинации	ИСП	1,75 [1,31; 2,21]	2,06 [1,51; 2,3]	1,59 [1,22; 2,15]
		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,08 [1,65; 3,38]	2,23 [1,61; 3,38]	2,86 [2,06; 4,23]
		<i>n</i>	47	49	45
3	На 10-е сутки после 2-й вакцинации	ИСП	2,17 [1,87; 3,05]	2,57 [1,98; 3,17]	2,17 [1,45; 2,79]
		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,30 [2,2; 4,37]	3,18 [2,28; 4,42]	4,15 [2,51; 5,09]
			$p_{1-2} = 0,020$	$p_{1-2} = 0,318$	$p_{1-2} = 0,195$
			$p_{1-3} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$
			$p_{2-3} = 0,020$	$p_{2-3} = 0,004$	$p_{2-3} = 0,006$
		Post-hoc-анализ ИСП с поправкой на множественность сравнений			

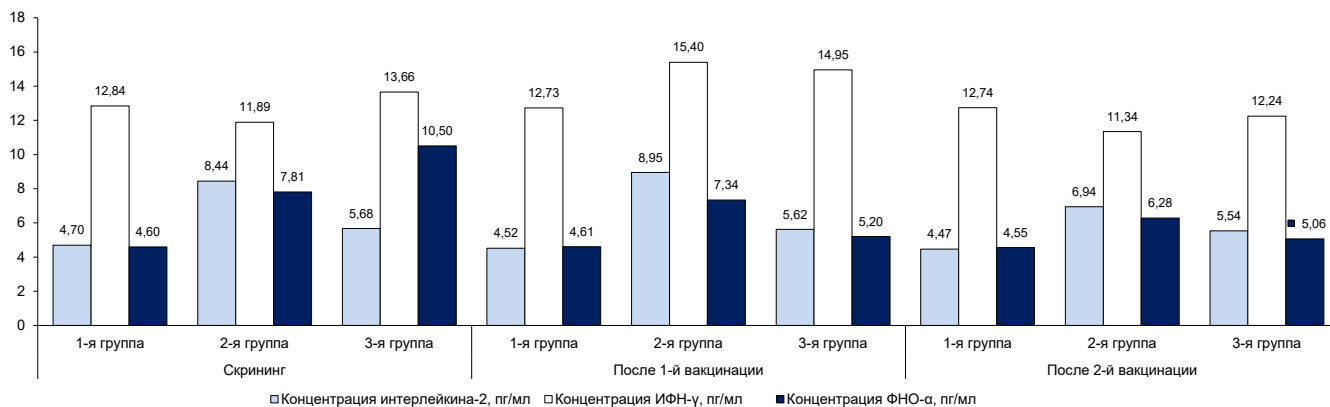


Рис. 5. Динамика уровня цитокинов в сыворотке крови добровольцев.

Обсуждение

Для профилактики инфекционных заболеваний наибольшее распространение получили инактивированные и живые вакцины. Однако появление и распространение новых инфекций, изменчивость их возбудителей и недавняя пандемия, коснувшаяся каждого, показывают необходимость разработки и совершенствования средств специфической терапии и профилактики. Параллельно с развитием технологии производства вакцин на основе мРНК, вирусных векторов, субъединичных вакцин набирает популярность технология получения VLP, которые представляют собой альтернативную платформу для разработки вакцин. Преимуществом такой платформы является возможность создания мультивалентных вакцин, которые способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунный ответ с продукцией вируснейтрализующих антител широкого спектра действия. Это важно при разработке вакцин для профилактики инфекций, вызываемых вирусами с высокой генетической изменчивостью, таких как SARS-CoV-2. При этом отсутствие генетического материала в VLP-вакцинах может гарантировать повышенный уровень безопасности, что подтверждается доклиническими исследованиями [13–15].

В ходе настоящей работы были проведены исследования переносимости, безопасности и иммуногенности новой вакцины против коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, в рамках ЭИ фазы клинических испытаний на здоровых добровольцах. Препарат представляет собой очищенные рекомбинантные VLP SARS-CoV-2, которые синтезированы в бакуловирусной системе экспрессии. Поверхностный S-белок в составе VLP представлен вариантами 19A, Alpha, Delta и Omicron. В состав вакцины входит адъювант на основе сквалена.

Основными задачами были оценка переносимости, безопасности и иммуногенности вакцины в сравнении с плацебо на протяжении 21 сут после двукратного внутримышечного введения, а также определение оптимальной дозы антигена для даль-

нейшего изучения безопасности и эффективности препарата в рамках II фазы клинических испытаний.

При разработке вакцин, в том числе для профилактики COVID-19, уделяется особое внимание исследованиям безопасности, ареактогенности и переносимости новых вакцин, т. к. эти показатели напрямую влияют на возможность широкого применения данных препаратов и уровень доверия населения к вакцинации. В частности, при исследовании инъекционных форм ряда мРНК-вакцин от COVID-19 выявлены как местные реакции, такие как боль в месте инъекции, так и серьезные побочные реакции, а некоторые публикации о безопасности вакцин, несмотря на возражения авторов, отозваны редакциями журналов. Вакцины на основе VLP зарекомендовали себя как высокоэффективные и безопасные, что было показано на примере вакцин против вируса папилломы человека (Gardasil, Gardasil9, Cervarix), гепатита E (Hecolin) гепатита B (Sci-B-Vac) и малярии (Mosquirix) [16–18].

По результатам представленного исследования НЯ отмечались как у добровольцев, привитых исследуемой вакциной с содержанием антигена 40 и 80 мкг в дозе, так и в группе иммунизированных плацебо. При этом большинство НЯ регистрировались в течение первых 10 сут после вакцинации, преимущественно после 1-й вакцинации. В период с 11-х по 21-е сутки после вакцинации НЯ отмечались в единичных случаях.

Большинство зарегистрированных НЯ со связью «вероятная» и «возможная» относились к ожидаемым побочным проявлениям после иммунизации на действие вакцинного препарата. Представляющие особый интерес НЯ, связанные с вакцинацией от COVID-19 (синдром Гийена–Барре, генерализованные судороги, анафилаксия, тромбоцитопения, коагулопатия и др.), не регистрировались ни у одного добровольца.

Выявленные колебания средних в клинических показателях крови и мочи до вакцинации и на различных сроках после прививки не позволяют

говорить о влиянии вакцинации на эти показатели и могут быть объяснены случайными факторами, перестройкой иммунной системы организма привитых в ответ на введение антигена.

Средние значения показателей жизненно важных функций в исследуемой группе находились в пределах нормы, а изменения данных параметров по результатам измерений, проводимых после начала применения препарата, по сравнению с исходными значениями были незначительными и в пределах референтных величин.

Во всех исследуемых группах отмечались значимые изменения в отдельных лабораторных показателях относительно скрининга. Важно отметить, что данные отклонения встречались как у добровольцев, получивших исследуемую вакцину в обеих дозах, так и в группе добровольцев, получивших плацебо. Отсутствие серьезных НЯ, связанных с вакцинацией, или летальных исходов в ходе исследования говорит о хорошей переносимости и безопасности применения вакцины с содержанием антигена как 40, так и 80 мкг в дозе.

Исследователи Медицинского центра Университета Радбауд в Неймегене (Нидерланды) проводили одноцентровое клиническое исследование с подбором доз адъювантной вакцины ABNCoV2 на основе VLP или капсидоподобных частиц (cVLP). На носитель cVLP ковалентно присоединён RBD гликопротеина шипа SARS-CoV-2. Исследовали 45 здоровых добровольцев в возрасте 18–55 лет, которые были иммунизированы внутримышечно, дважды. У участников в течение недели после вакцинации было в общей сложности 249 НЯ, возможно, связанных с вакцинацией (185 — степени 1; 63 — степени 2; 1 — степени 3). Произошли 2 серьезных НЯ; одно было классифицировано как возможная нежелательная реакция [19].

VLP разработанной вакцины способны оказывать сильное иммуностимулирующее действие на организм, активируя Т- и В-лимфоциты, т. к. содержат основные иммуногенные белки SARS-CoV-2 в нативной конформации. Они легко проникают в лимфатические узлы и поглощаются антиген-презентирующими клетками, в частности дендритными клетками, с последующей презентацией антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II [19, 20].

Исследования иммуногенности разработанной вакцины против SARS-CoV-2 в рамках I фазы клинических испытаний показали, что введение добровольцам вакцины с содержанием антигена 40 и 80 мкг индуцировало достоверный рост СГТ в сравнении с плацебо. При этом реакция иммунного ответа была сильнее у добровольцев, у которых изначально отмечались низкие титры антител (в РН — титр $\leq 1/80$, ИФА — титр $\leq 1/800$). При наличии у добровольцев высоких титров антител

($1/1600$ – $1/3200$ и $\geq 1/6400$ в ИФА) на скрининге данные показатели иммуногенности были ниже и сероконверсии не наблюдалось. Необходимо отметить, что вируснейтрализующие антитела вырабатывались к различным штаммам SARS-CoV-2, включая клады 19A, Delta и Omicron. В 3-й группе у ряда добровольцев отмечалось нарастание титров антител, однако 4-кратного увеличения не наблюдалось. Следует отметить, что у включённых в исследование лиц не выявлено COVID-19.

Во 2-й группе показатели иммуногенности в ИФА незначительно, но превосходили как значения в целом в популяции, так и у добровольцев с исходно низким и высоким титрами антител. Показатели напряжённости иммунного ответа, нарастание титров антител, в том числе 4-кратное, в РН также были выше во 2-й группе, особенно это касается актуального и преобладающего в настоящее время штамма Omicron. Так, в данной группе СГТ составил 275,24, кратность прироста — 3,1, а в 1-й группе СГТ равен 160, кратность прироста — 2,0.

Высокие показатели иммунного ответа в 3-й группе говорят, скорее всего, о перенесённом заболевании COVID-19 в стёртой форме, которое не проявлялось клинически и не подтверждалось ПЦР-тестом. Важно отметить, что данное исследование проводилось в разгар эпидемии, главным инфекционным агентом в тот момент был штамм Omicron.

Также следует отметить недостаточную чувствительность некоторых коммерческих ИФА-тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2 [21]. Например, при гриппе у 50–80% невакцинированных взрослых людей появляются антитела без признаков заболевания [22]. Ряд исследователей отмечают, что до 80% случаев инфицирования COVID-19 может протекать бессимптомно [23, 24].

Исследователи из Нидерландов изучали иммунный ответ 45 добровольцев, которые были иммунизированы вакциной ABNCoV2 на основе cVLP с разным количеством антигена: 6, 12, 25, 50 или 70 мкг [19]. Отмечено дозозависимое формирование антител после 2-й вакцинации при иммунизации вакцинами, содержащими 25–70 мкг антигена. Антитела нейтрализовали основные варианты SARS-CoV-2, но вируснейтрализующая активность была ниже с вариантом Omicron (BA.1), были активированы специфические интерферон- γ (ИФН- γ)⁺CD4⁺-Т-клетки. Общий вывод исследователей: иммунизация вакциной хорошо переносилась, была безопасной и привела к функциональному иммунному ответу.

Инфекция SARS-CoV-2 вызывает иммунные реакции, которые могут иметь важное значение для разработки стратегии вакцинации. Т-клеточный иммунитет играет центральную роль в борьбе с инфекцией SARS-CoV-2. Антиген-специфические CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки и нейтрализующие

антитела играют защитную роль против SARS-CoV-2, в то время как нарушение адаптивного иммунного ответа, а именно нехватка наивных Т-клеток, может привести к неблагоприятным исходам заболевания.

При исследовании иммунного ответа важной является оценка степени дисбаланса цитокинов и активации иммунных клеток. Мимикрия антигена между вирусными белками и белками человека может приводить к развитию иммуноопосредованного гемолиза, снижению числа лейкоцитов, цитокиновому шторму, прокоагулянтному состоянию и активации макрофагов [25]. Синтез цитокинов ИФН- γ , интерлейкина-2, ФНО- α обуславливает Th1-тип иммунного ответа [26]. ИФН- γ и интерлейкин-2 активируют макрофаги, естественные клетки-киллеры и цитотоксические лимфоциты, которые имеют решающее значение для элиминации вируса. ИФН- γ является наиболее мощным фактором активации макрофагов. Полная активация макрофагов может быть обеспечена низкими уровнями ИФН- γ . При разработке вакцин важно избежать токсичности, связанной с его чрезмерной активацией.

Аномальная стимуляция Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток (дендритных клеток, макрофагов и В-клеток) может приводить к развитию цитокинового шторма, генерируемого подавляющим высвобождением цитокинов, в частности ФНО- α , который способствует миграции из сосудов нейтрофилов и активации путей свёртывания крови. Гипервоспалительные реакции коррелируют с повышенными уровнями сывороточных интерлейкина-2, -6 и -7 [27, 28].

Разработанная VLP-вакцина может быть индуктором клеточно-опосредованного иммунного ответа, при котором не изменяется соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов ни в сторону хелперных, ни в сторону цитотоксических лимфоцитов. При этом поствакцинальное изменение уровня цитокинов недостаточно для развития иммунопатологических состояний, связанных с избыточной продукцией исследуемых провоспалительных цитокинов.

При использовании разработанной вакцины выражено увеличилось образование антител и нарастал клеточный ответ по мере увеличения количества иммунизаций. Однако показатели иммуногенности, полученные после иммунизации вакциной с содержанием антигена 80 мкг в дозе, превосходили показатели, полученные при иммунизации вакциной с содержанием антигена 40 мкг в дозе (особенно применительно к штамму Omicron), поэтому в рамках I этапа клинических испытаний данная доза выбрана как оптимальная.

Заключение

Проведена оценка переносимости, безопасности и иммуногенности новой вакцины для профи-

лактики COVID-19 на основе VLP в рамках I фазы клинических испытаний на 180 добровольцах. Показано, что вакцинация препаратами с содержанием антигена 40 и 80 мкг в дозе внутримышечно двукратно с интервалом 21 день не вызывает серьезных НЯ и индуцирует гуморальный и клеточный иммунный ответ. При этом не изменяется соотношение CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов ни в сторону хелперных, ни в сторону цитотоксических лимфоцитов. Поствакцинальное изменение уровня цитокинов недостаточно для развития иммунопатологических состояний, связанных с избыточной продукцией исследуемых провоспалительных цитокинов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Chen N., Zhou M., Dong X., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–13.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30211-7)
- Усков А.Н., Лобзин Ю.В., Рычкова С.В. и др. Течение новой коронавирусной инфекции у детей: некоторые аспекты мониторинга заболеваемости и анализа летальности. *Журнал инфектологии*. 2020;12(3):12–20. Uskov A.N., Lobzin Yu.V., Rychkova S.V., et al. Course of a new coronavirus infection in children: some aspects of monitoring and analysis of mortality. *Journal Infectology*. 2020;12(3):12–20.
DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-3-12-20>
EDN: <https://elibrary.ru/jyuxsy>
- Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Никоноров Ю.М. и др. Бетакоронавирус SARS-CoV-2, его геном, разнообразие генотипов и молекулярно-биологические меры борьбы с ним. *Биомика*. 2020;12(2):242–71. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Nikonorov Yu.M., et al. Betacoronavirus SARS-CoV-2, its genome, variety of genotypes and molecular-biological approaches to combat it. *Biomics*. 2020;12(2):242–71.
DOI: <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15>
EDN: <https://elibrary.ru/dhderx>
- Горенков Д.В., Хантмирова Л.М., Шевцов В.А. и др. Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β -коронавирусы как угроза глобальному здравоохранению. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(1):6–20. Gorenkov D.V., Khantimirova L.M., Shevtsov V.A., et al. An outbreak of a new infectious disease COVID-19: β -coronaviruses as a threat to global healthcare. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):6–20.
DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-6-20>
EDN: <https://elibrary.ru/euulmy>
- Романов Б.К. Коронавирусная инфекция COVID-2019. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(1):3–8. Romanov B.K. Coronavirus disease COVID-2019. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2020;8(1):3–8.
DOI: <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-1-3-8>
EDN: <https://elibrary.ru/vzvbrk>
- Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я. и др. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020;10(2):87–93. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., et al. New coronavirus infection (COVID-19): Clinical and epidemiological aspects. *Archive of Internal Medicine*. 2020;10(2):87–93.
DOI: <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93>
EDN: <https://elibrary.ru/melbop>

7. Tregoning J.S., Brown E.S., Cheeseman H.M., et al. Vaccines for COVID-19. *Clin. Exp. Immunol.* 2020;202(2):162–92. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.13517>
8. Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области. *Вопросы вирусологии.* 2022;67(6):496–505. Ozhmegova E.N., Savochkina T.E., Prilipov A.G., et al. Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region. *Problems of Virology.* 2022;67(6):496–505. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146> EDN: <https://elibrary.ru/crgiww>
9. Ghafouri F., Cohan R.A., Noorbakhsh F., et al. An in-silico approach to develop of a multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2 envelope (E) protein. *Res. Sq.* 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-30374/v1>
10. Аyyagari V.S., Venkateswarulu T.C., Abraham Peele K., Sri-rama K. Design of a multi-epitope-based vaccine targeting M-protein of SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022;40(7):2963–77. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1850357>
11. Gupta T., Gupta S.K. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *Int. Immunopharmacol.* 2020;86:106717. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>
12. Латышев О.Е., Зайкова О.Н., Елисеева О.В. и др. Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2024;69(2):175–86. Latshev O.E., Zaykova O.N., Eliseeva O.V., et al. Development, production and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Problems of Virology.* 2024;69(2):175–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226> EDN: <https://elibrary.ru/gkxfed>
13. Banihashemi S.R., Es-Haghi A., Fallah Mehrabadi M.H., et al. Safety and efficacy of combined intramuscular/intranasal RAZI-COV PARS vaccine candidate against SARS-CoV-2: a preclinical study in several animal models. *Front. Immunol.* 2022;13:836745. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836745>
14. Vakhrusheva A.V., Kudriavtsev A.V., Kryuchkov N.A., et al. SARS-CoV-2 subunit virus-like vaccine demonstrates high safety profile and protective efficacy: Preclinical study. *Vaccines (Basel).* 2022;10(8):1290. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10081290>
15. Чернорыж Я.Ю., Кондратьева В.М., Малкова А.П. и др. Доклинические исследования безопасности интраназальной вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2025;70(1):35–46. Chernoryzh Ya.Y., Kondratieva V.M., Malkova A.P., et al. Pre-clinical safety studies of intranasal virus-like particles based vaccine for prevention of COVID-19. *Problems of Virology.* 2025;70(1):35–46. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-278> EDN: <https://elibrary.ru/fzgyxe>
16. Yang X., Chen M., Cao L., Zhao M. Bibliometric analysis of scientific papers on adverse reactions to COVID-19 vaccines published between 2019 and 2023. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2023;19(3):2270194. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2270194>
17. Kombe Kombe A.J., Li B., Zahid A., et al. Epidemiology and burden of human papillomavirus and related diseases, molecular pathogenesis, and vaccine evaluation. *Front. Public Health.* 2021;8:552028. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.552028>
18. Nooraee S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology.* 2021;19(1):59. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>
19. Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., et al. First-in-human use of a modular capsid virus-like vaccine platform: an open-label, non-randomised, phase 1 clinical trial of the SARS-CoV-2 vaccine ABNCov2. *Lancet Microbe.* 2023;4(3):e140–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00337-8](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00337-8)
20. Tariq H., Batool S., Asif S., et al. Virus-like particles: revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases. *Front. Microbiol.* 2022;12:790121. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790121>
21. Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2020;26(7):1478–88. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
22. Медуницын Н.В., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2016;16(4):195–207. Medunitsyn N.V., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2016;16(4):195–207. EDN: <https://elibrary.ru/xehmax>
23. Кроткова Е.Н., Кузнецов О.Е., Горчакова О.В. Оценка популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения г. Гродно. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2021;19(5):489–95. Krotkova E.N., Kuznetsov O.E., Gorchakova O.V. Assessment of population immunity to the SARS-CoV-2 virus among the population of Grodno. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2021;19(5):489–95. DOI: <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-5-489-495>
24. Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020;53(3):404–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
25. Liu Y., Sawalha A.H., Lu Q. COVID-19 and autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2021;33(2):155–62. DOI: <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000776>
26. Мезенцева М.В., Антошина И.Ф., Морозова О.В. Синтез цитокинов *in vitro* при инфекции культуры клеток человека вирусом клещевого энцефалита и в присутствии инактивированной вакцины. *Инфекция и иммунитет.* 2014;4(1):37–42. Mesentseva M.V., Antoshina I.F., Morozova O.V. The cytokines synthesis *in vitro* in the tick-borne encephalitis virus infected cells and in the presence of inactivated vaccine. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2014;4(1):37–42. EDN: <https://elibrary.ru/rzjgcz>
27. Landete P., Quezada Loaiza C.A., Aldave-Orzaiz B., et al. Clinical features and radiological manifestations of COVID-19 disease. *World. J. Radiol.* 2020;12(11):247–60. DOI: <https://doi.org/10.4329/wjr.v12.i11.247>
28. Luo X.H., Zhu Y., Mao J., Du R.C. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. *Scand. J. Immunol.* 2021;93(3):e12989. DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.12989>

Информация об авторах

Гребенникова Татьяна Владимировна[✉] — д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной диагностики, зам. директора по научной работе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель Испытательного центра НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, t_grebennikova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Зайкова Ольга Николаевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, zaykova_o_n@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Плотников Алексей Андреевич — аспирант, м. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, alesp@ya.ru, <https://orcid.org/0009-0009-1253-1152>

Костина Людмила Владимировна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, lvkostina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Чернорыж Яна Юрьевна — канд. мед. наук, н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, revengeful_w@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Елисеева Олеся Васильевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olesenka80@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Латышев Олег Евгеньевич — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, oleglat80@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Ларичев Виктор Филиппович — д-р мед. наук, в. н. с. лаб. биологии и индикации арбовирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, vlaritchev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Федякина Ирина Тимофеевна — канд. биол. наук, зав. лаб. экологии вирусов, в. н. с. отдела экологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, irfed2@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Лосич Милана Анатольевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики группы сравнительной вирусологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, mkohnovich@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Кириллов Илья Михайлович — с. н. с. лаб. экологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, iliyakirillov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4933-850X>

Филатов Илья Евгеньевич — м. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, filat69rus@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Баландина Марина Владимировна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, mbalandina77mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Цибезов Валерий Владимирович — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. средств специфической профилактики вирусных болезней НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, tsibezov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Юрлов Кирилл Иванович — н. с. лаб. клеточной инженерии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, kir34292@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Леснова Екатерина Ивановна — н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, wolf252006@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Кондратьева Валерия Михайловна — аспирант лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, 1999valeriak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9163-4516>

Козлова Аллина Александровна — канд. биол. наук, н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, malinkakozlova88@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Баранец Марина Сергеевна — канд. мед. наук, н. с. лаб. молекулярной диагностики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, shizotorex@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3466-3588>

Гинцбург Александр Леонидович — д-р биол. наук, профессор, академик РАН, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, gintzburg@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Information about the authors

Tatiana V. Grebennikova[✉] — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corresponding Member of RAS, Head, Laboratory of molecular diagnostics, Head, Deputy Director for scientific work, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Head, Testing Center, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, t_grebennikova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Olga N. Zaykova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, researcher, Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, zaykova_o_n@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Alexey A. Plotnikov — postgraduate student, junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, alesp@ya.ru, <https://orcid.org/0009-0009-1253-1152>

Lyudmila V. Kostina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, researcher, Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, lvkostina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Yana Yu. Chernoryzh — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, revengeful_w@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Olesia V. Eliseeva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, olesenka80@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Oleg E. Latyshev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, oleglat80@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Viktor F. Larichev — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of biology and indication of arboviruses, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, vlaritchev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Irina T. Fedyakina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of virus ecology, leading researcher, Department of virus ecology, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, irfed2@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Milana A. Losich — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, Group of comparative virology, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, mkohnovich@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Ilya M. Kirillov — senior researcher, Laboratory of virus ecology, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, iliyakirillov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4933-850X>

Ilya E. Filatov — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, filat69rus@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Marina V. Balandina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, mbalandina77mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Valery V. Tsibezov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of specific means of prevention of viral diseases, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, tsibezov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Kirill I. Yurlov — researcher, Laboratory of cellular engineering, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, kir34292@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Ekaterina I. Lesnova — researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, wolf252006@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Valeria M. Kondratieva — postgraduate student, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, 1999valeriak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9163-4516>

Alina A. Kozlova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Ga-

Участие авторов: *Гребенникова Т.В.* — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование текста, формирование окончательного варианта статьи для публикации; *Зайкова О.Н.* — работа с культурой клеток, написание текста статьи, оформление результатов; *Плотников А.А.* — мониторинг клинического исследования, оформление результатов; *Костина Л.В.* — работа с культурой клеток, получение и характеристика препарата; *Чернорыж Я.Ю.* — исследование клеточного иммунитета, статистический анализ; *Елисеева О.В.* — контроль качества полученного препарата; *Латышев О.Е.* — получение и характеристика препарата; *Ларичев В.Ф., Федякина И.Т.* — исследование иммуногенности в реакции нейтрализации; *Лосич М.А.* — работа с культурой клеток, получение и характеристика препарата; *Кириллов И.М.* — очистка антигена вакцины; *Филатов И.Е.* — исследование иммуногенности в реакции ИФА (специфические IgG); *Баландина М.В.* — исследование динамики продукции цитокинов; *Цибезов В.В.* — исследование иммуногенности в реакции ИФА, интерпретация данных; *Юрлов К.И.* — исследование клеточного иммунитета; *Леснова Е.И., Кондратьева В.М.* — исследование клеточного иммунитета; *Козлова А.А., Баранец М.С.* — исследование иммуногенности в реакции нейтрализации; *Гинцбург А.Л.* — организационная сторона клинических исследований. 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 20.02.2025;
принята к публикации 21.04.2025;
опубликована 28.04.2025

maleya, Moscow, Russia, malinkakozlova88@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Marina S. Baranets — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of molecular diagnostics, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, shizotorex@mai.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3466-3588>

Aleksandr L. Gintsburg — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician RAS, Director, NRCEM named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, gintsburg@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Authors' contribution: *Grebennikova T.V.* — study concept and design, data analysis and interpretation, text editing, preparation of the final version of the article for publication; *Zaykova O.N.* — cell culture processing, article writing, results presentation; *Plotnikov A.A.* — clinical trial monitoring, results presentation; *Kostina L.V.* — cell culture processing, drug production and characterization; *Chernoryzh Ya.Yu.* — cellular immunity study, statistical analysis; *Eli-seeva O.V.* — quality control of the obtained drug; *Latyshev O.E.* — drug production and characterization; *Larichev V.F., Fedyakina I.T.* — immunogenicity study in the neutralization reaction; *Losich M.A.* — cell culture processing, drug production and characterization; *Kirillov I.M.* — vaccine antigen purification; *Filatov I.E.* — immunogenicity study in the ELISA reaction (specific IgG); *Balandina M.V.* — cytokine production dynamics study; *Tsibezov V.V.* — study of immunogenicity in ELISA reaction, data interpretation; *Yurlov K.I.* — study of cellular immunity; *Lesnova E.I., Kondratieva V.M.* — study of cellular immunity; *Kozlova A.A., Baranets M.S.* — study of immunogenicity in neutralization reaction; *Ginzburg A.L.* — organizational aspect of clinical trials. 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 20.02.2025;
accepted for publication 21.04.2025;
published 28.04.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-614>



Молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом

Чагарян А.Н.^{1✉}, Иванчик Н.В.¹, Кузьменков А.Ю.¹, Козлов Р.С.^{1, 2}, Гапонова И.И.², Миронов К.О.²

¹Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск, Россия;

²Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — дать ключевые характеристики изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих на территории России в 2015–2020 гг. и выделенных от больных пневмококковым менингитом, на основании данных высокопроизводительного секвенирования, включая глобальные кластеры пневмококковых последовательностей, серотипы, факторы вирулентности и генетические детерминанты резистентности, в сравнении с клиническими данными по чувствительности к антимикробным препаратам (АМП).

Материалы и методы. Исследовано 68 инвазивных изолятов *S. pneumoniae*, выделенных из крови и ликвора пациентов с бактериальным менингитом в разных регионах России в 2015–2020 гг. Видовую идентификацию проводили с учётом морфологии колоний на кровяном агаре, наличия α-гемолиза, отрицательной каталазной реакции, чувствительности к оптохину, положительных результатов латекс-агглютинации. Чувствительность изолятов к АМП определяли методом микроразведений в бульоне, категории чувствительности — на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК). Проводили полногеномное секвенирование изолятов *S. pneumoniae*, анализ изолятов на сигнатуру пенициллинсвязывающих белков, определение глобальных кластеров пневмококковых последовательностей, аллелей MLST, серотипов, сиквенс-типов и генов приобретённой резистентности (*mefA*, *ermB*, *tetM*, *folA/P*, *caf*), идентифицировали гены вирулентности.

Результаты. Выявлены 28 GPSC, 45 сиквенс-типов и 27 серотипов. Степень охвата ППВ-23 и ПКВ-13 составила 78 и 59% соответственно. Доминировали серотипы 3 (18%), 19F (9%), 23F (7%) и 15B (6%). Преобладала (43%) линия GPSC12 (серотип 3). Линии, экспрессирующие вакцинные серотипы GPSC1(19F), GPSC6(14), GPSC13(6A), GPSC904(14) и GPSC10(19F), обладали множественной антимикробной резистентностью, включая резистентность к пенициллину. Резистентные линии, экспрессирующие невакцинные серотипы, — GPSC230 (13) и GPSC177 (35F). В большинстве случаев установлено соответствие генотипической и фенотипической резистентности к пенициллину (повышенные МПК β-лактамов коррелировали с типами пенициллинсвязывающих белков), эритромицину (*ermB*, *mefA*, *ermB/mefA*), клиндамицину (*ermB*) и тетрациклину (*tetM*) и триметоприму-сульфаметоксазолу (*folA*, *folP*). У всех изолятов обнаружены гены вирулентности *cbpG*, *lytA*, *pce/cbpE*, *pavA*, *ptfA*, *ply*, *hysA*, *nanA* и *cps4A*. Цинковая металлопротеиназа С обнаружена у 13% изолятов.

Заключение. Выявлено высокое разнообразие серотипов и линий среди изолятов пневмококков, выделенных у больных менингитом. Из 68 изолятов *S. pneumoniae*, выделенных у пациентов с бактериальным менингитом, более 17% относились к невакцинным серотипам. Результаты сопоставления фенотипической и генотипической антимикробной резистентности характеризовались хорошей конкордантностью, что указывает на необходимость дальнейшего изучения возможности использования полногеномного секвенирования в качестве диагностического инструмента для выявления механизмов резистентности у клинических изолятов пневмококков.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, инвазивные пневмококковые инфекции, полногеномное секвенирование, мультилокусное секвенирование-типирование, резистентность к антимикробным препаратам, пенициллинсвязывающие белки, глобальный кластер пневмококковых последовательностей, серотипы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Независимым междисциплинарным комитетом по этической экспертизе клинических исследований (протокол № 1 от 17.01.2020).

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: Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С., Гапонова И.И., Миронов К.О. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):150–161. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-614>
EDN: <https://www.elibrary.ru/NRAEKS>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-614>

Molecular and biological characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with pneumococcal meningitis

Aida N. Chagaryan^{1✉}, Natali V. Ivanchik¹, Alexey Yu. Kuzmenkov¹,
Roman S. Kozlov^{1,2}, Irina I. Gaponova², Konstantin O. Mironov²

¹Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the study is to provide key characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates circulating in Russia in 2015–2020 and isolated from pneumococcal meningitis patients based on high-throughput sequencing data, including global pneumococcal sequence clusters, serotypes, virulence factors and genetic determinants of resistance, in comparison with clinical data on antimicrobial susceptibility.

Materials and methods. We studied 68 invasive *S. pneumoniae* isolates from blood and cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis in different regions of Russia in 2015–2020. Species identification was performed taking into account the morphology of colonies on blood agar, the presence of α -hemolysis, negative catalase reaction, sensitivity to optoquine, and positive latex-agglutination results. The sensitivity of isolates to antimicrobials was determined by microdilution in broth, and sensitivity categories were determined based on borderline values of minimum inhibitory concentrations (MICs). Whole genome sequencing of *S. pneumoniae* isolates, analysis of isolates for penicillin-binding protein signature, determination of global pneumococcal sequence clusters, MLST alleles, serotypes, sequence types and acquired resistance genes (*mefA*, *ermB*, *tetM*, *folA/P*, *cat*), identification of virulence genes were carried out.

Results. Twenty-eight GPSCs, 45 sequence types and 27 serotypes were identified. The coverage rates of PPV-23 and PCV-13 were 78% and 59%, respectively. Serotypes 3 (18%), 19F (9%), 23F (7%) and 15B (6%) were predominant. The GPSC12 lineage (serotype 3) was predominant (43%). Lineages expressing vaccine serotypes GPSC1(19F), GPSC6(14), GPSC13(6A), GPSC904(14) and GPSC10(19F) exhibited multiple antimicrobial resistance, including penicillin resistance. The resistant lineages expressing non-vaccine serotypes were GPSC230 (13) and GPSC177 (35F). In most cases, genotypic and phenotypic resistance to penicillin (increased MICs of β -lactams correlated with types of penicillin-binding proteins), erythromycin (*ermB*, *mefA*, *ermB/mefA*), clindamycin (*ermB*) and tetracycline (*tetM*), and trimethoprim-sulfamethoxazole (*folA*, *folP*) was found to be consistent. The virulence genes *cbpG*, *lytA*, *pce/cbpE*, *pavA*, *pfbA*, *ply*, *hysA*, *nanA* and *cps4A* were detected in all isolates. Zinc metalloproteinase C was detected in 13% of isolates.

Conclusion. A high diversity of serotypes and lineages among pneumococcal isolates from meningitis patients was revealed. Out of the 68 *S. pneumoniae* isolates from patients with bacterial meningitis, more than 17% belonged to non-vaccine serotypes. The results of phenotypic and genotypic antimicrobial resistance comparison were characterized by good concordance, which indicates the necessity for further study of the possibility of using whole-genome sequencing as a diagnostic tool to identify resistance mechanisms in clinical isolates of pneumococci.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, invasive pneumococcal infections, whole-genome sequencing, multilocus sequencing-typing; antimicrobial resistance, penicillin-binding proteins, global pneumococcal sequence cluster, serotypes

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Independent Interdisciplinary Committee for the Ethical Review of Clinical Trials (Protocol No. 1, January 17, 2020).

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: Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kuzmenkov A.Yu., Kozlov R.S., Gaponova I.I., Mironov K.O. Molecular and biological characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with pneumococcal meningitis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):150–161.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-614>

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

Введение

Streptococcus pneumoniae является патогеном дыхательных путей человека и основной причиной заболеваемости и смертности во всём мире. *S. pneumoniae* — 4-я по частоте причина смертельных инфекций, таких как септицемия и менингит, и является, по оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), причиной 1,6 млн смертей, из которых 0,7–1,0 млн приходится на детей в возрасте до 5 лет, в основном в развивающихся странах [1–3]. Поверхностные капсульные полисахариды *S. pneumoniae* являются одними из наиболее важных факторов вирулентности и основой серотипирования пневмококка. В настоящее время известны более 100 серотипов *S. pneumoniae* [4]. Благодаря своей способности приобретать экзогенную ДНК пневмококк может переключать серотипы и получать гены резистентности к антибиотикам [5]. Бесконтрольное использование антимикробных препаратов (АМП), избирательное давление пневмококковых вакцин, высокий уровень генетической рекомбинации *S. pneumoniae* ведут к изменению популяции пневмококков: возникновению новых невакцинных серотипов, появлению изолятов со множественной антимикробной резистентностью, изменению профиля вирулентности. В 2024 г. ВОЗ включила *S. pneumoniae*, резистентный к макролидам, в обновлённый список приоритетных бактериальных патогенов среднего уровня¹.

В настоящее время технологии полногеномного секвенирования позволяют получить информацию о генетических изменениях, серотипах, сиквенс-типах, определённых как по «классической» 7-локусной схеме, так и по «основному геному» (core genome MLST), профиле вирулентности, статусе антимикробной резистентности пневмококков, что является важным для эпидемиологического надзора [6–10].

Цель исследования: дать ключевые характеристики изолятов *S. pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковым менингитом, циркулирующих на территории России в 2015–2020 гг., на основании данных высокопроизводительного секвенирования, включая глобальные кластеры пневмококковых последовательностей, серотипы, факторы вирулентности и генетические детерминанты резистентности, в сравнении с клиническими данными по чувствительности к АМП.

Материалы и методы

Проведено исследование факторов вирулентности и генов резистентности у 68 инвазивных изолятов *S. pneumoniae*, выделенных из крови и ликво-

ра пациентов с диагнозом «бактериальный менингит». Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Независимым междисциплинарным комитетом по этической экспертизе клинических исследований (протокол № 1 от 17.01.2020).

Все изоляты были получены при проведении различных этапов многоцентрового исследования «ПеГАС» в 2015–2020 гг. в разных регионах России [11]. Выделение и первичную идентификацию изолятов проводили в локальных микробиологических лабораториях центров — участников исследования в рамках стандартной процедуры бактериологического исследования биологического материала, полученного от пациентов с диагнозом «бактериальный менингит» и в соответствии с МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов». Транспортировку изолятов *S. pneumoniae* в центральную лабораторию Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИАХ) осуществляли на модифицированной среде Дорсэ. В НИИАХ проводились оценка соответствия присланных изолятов критериям включения, идентификация с учётом морфологии колоний на кровяном агаре («HEM»), наличия α -гемолиза, отрицательной каталазной реакции, чувствительности к оптохину («Oxoid») и положительных результатов латекс-агглютинации с использованием набора «DrySpot Pneumo» («Oxoid»). До момента определения чувствительности к АМП все изоляты хранили в пробирках с триптиказо-соевым бульоном («bioMérieux») с добавлением 30% стерильного глицерина («Sigma») при -70°C . Контаминированные и нежизнеспособные изоляты были исключены из исследования. Чувствительность к АМП определяли методом микроразведения в бульоне в соответствии с требованиями ISO 20776-1:2020², категории чувствительности изолятов к АМП — на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) в соответствии со стандартами EUCAST³ и российскими рекомендациями⁴. Для контроля ка-

¹ WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. URL: <https://who.int/publications/i/item/9789240093461>

² Национальный стандарт ГОСТ Р ИСО 2077612022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни).

³ European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 14.0, 2024. URL: www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения 01.11.2024).

⁴ Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Смоленск; 2024. 192 с.

чества определения чувствительности параллельно с исследуемыми изолятами тестировали референсный штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Полногеномное секвенирование проводили на базе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Пробоподготовку вели по протоколу «Nextera» («Illumina»). Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе «HiSeq 1500» с использованием наборов «HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2» и «HiSeq Rapid SBS Kit v2» («Illumina»). Полногеномные нуклеотидные последовательности собирали с использованием программы «SPAdes v. 3.13». Подробное описание методики пробоподготовки для полногеномного секвенирования приведено нами ранее [12].

Полногеномные нуклеотидные последовательности изученных изолятов, данные о серотипах и чувствительности к антибиотикам, а также информация об источниках штаммов внесены в базу PubMLST⁵: идентификационные номера: 51080–51125, 73010–73011, 73013–73015, 73017–73033.

Инвазивные изоляты пневмококков были проанализированы на сигнатуру пенициллинсвязывающих белков (ПСБ), где комбинация 3 сигнатур (PBP1A, PBP2B, PBP2X) определяет уровень резистентности к β-лактамам, были определены глобальные кластеры пневмококковых последовательностей, аллели MLST, серотипы, сиквенс-типы и гены приобретённой резистентности (*mefA*, *ermB*, *tetM*, *folA/P*, *cat*) с использованием инструмента, доступного на Pathogenwatch — глобальной платформе геномного наблюдения⁶. Гены вирулентности идентифицировали с помощью онлайн-программы AMRseq⁷ и программы BacWGSTdb⁸.

Исследование не являлось интервенционным и не предполагало сравнения групп. Для представления результатов использовали методы описательной статистики с определением абсолютного и относительного количества наблюдений.

Результаты

Молекулярно-биологическая характеристика инвазивных изолятов *S. pneumoniae*

Нами выявлено 28 глобальных кластеров пневмококковых последовательностей (GPSC), 45 сиквенс-типов и 27 серотипов (табл. 1).

Анализ полногеномных данных показал, что среди инвазивных изолятов преобладали серотипы, входящие в состав пневмококковой полисахарид-

ной 23-валентной вакцины (ППВ-23) и пневмококковой конъюгированной вакцины 13 (ПКВ-13) — 3 (18%), 19F (9%), 23F (7%) и 15B (6%). Степень охвата ППВ-23 составила 79%, ПКВ-13 — 59%. Частота выделения пневмококков невакцированных се-

Таблица 1. Глобальные кластеры пневмококковых последовательностей, ассоциированные с сиквенс-типами и серотипами

Глобальные кластеры пневмококковых последовательностей	Сиквенс-типы	Серотипы	Количество изолятов, n (%)
1	236	19F	2 (7)
2	15249	1	1 (4)
3	1012	11A	1 (4)
6	3418, 143	6E(6B),14	2 (7)
7	311, 152248, 16095, 311	23F	4 (14)
10	230	19F	1 (4)
11	1262	15B	2 (7)
12	505, 180, 15251, 15250, 2049	3	12 (43)
13	12493, 473	6A, 6B	2 (7)
16	66, 16098	9N	2 (7)
19	433	22F	2 (7)
32	3244, 11901,2824, 3544	7F, 8	4 (14)
38	393	38	1 (4)
43	239	9V	3 (11)
44	179	19F	1 (4)
49	440	23F	1 (4)
68	15252, 3187	18C	2 (7)
76	490	6A	1 (4)
98	1480	8	1 (4)
123	447	37	1 (4)
162	2361	4	2 (7)
177	2991	35F	2 (7)
212	6202	12F, 15F	4 (14)
229	1025	15B, 15C	3 (11)
230	2754	13	1 (4)
365	225	28A	2 (7)
376	9247	6E(6B)	1 (4)
904	782	14	1 (4)
Not assigned	15	19F	2 (7)
Not assigned	15247	10C	1 (4)
Not assigned	5205	8	1 (4)
Not assigned	13459	10A	1 (4)
Not assigned	16099	4	1 (4)

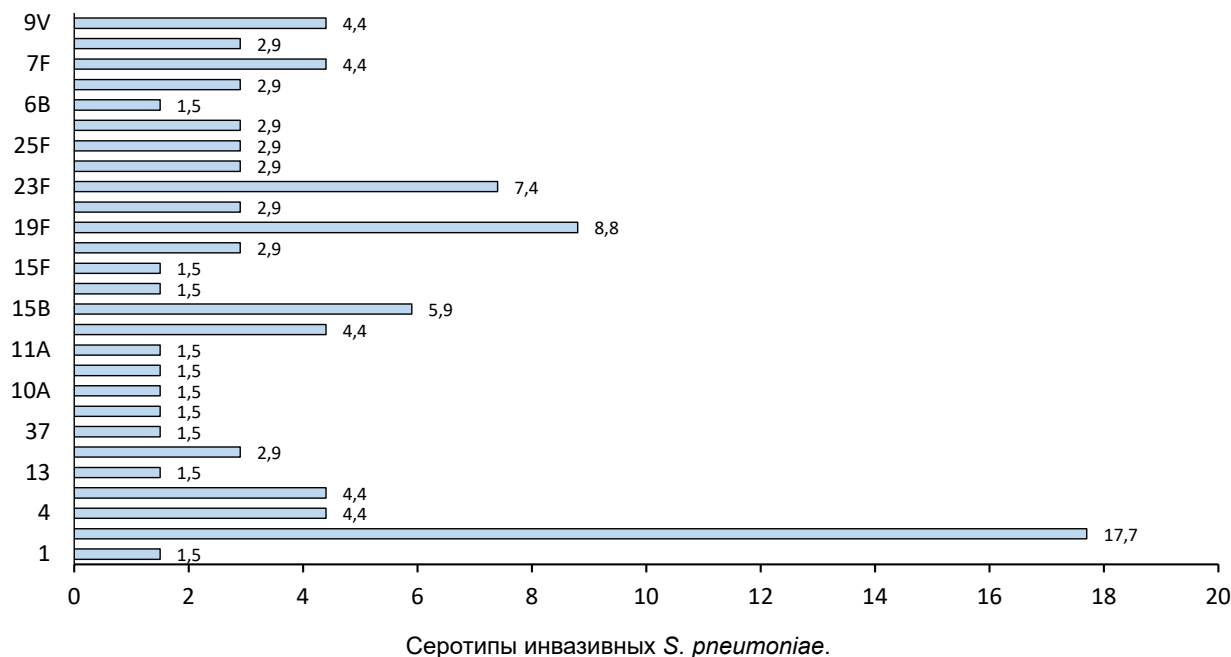
Примечание. Not assigned — не назначен номер глобального кластера пневмококковых последовательностей.

⁵ Streptococcus pneumoniae MLST Databases.
URL: <https://pubmlst.org/spneumoniae/>
(дата обращения: 17.02.2020).

⁶ A Global Platform for Genomic Surveillance.
URL: <https://pathogen.watch>

⁷ AMRseq. URL: <https://amrseq.net/ru/>

⁸ BacWGSTdb. URL: <http://bacdb.cn/BacWGSTdb/index.php>



ротипов при менингите в России: 28A и 35F — по 3%; 13, 37, 38, 10C, 15C и 15F — более 1% (**рисунок**).

Из 28 GPSC 20 GPSC были представлены вакцинными серотипами, 6 GPSC — невакцинными серотипами. Две линии — GPSC212 (12F, 15F) и GPSC229 (15B, 15C) — экспрессировали серотипы как вакцинных, так и невакцинных серотипов. Линия GPSC12 экспрессировала только 3-й вакцинный серотип и составила более 42%. В ряде случаев один и тот же серотип был связан с разными линиями. Второй по частоте встречаемости серотип, 19F, экспрессировался линиями GPSC1, 10, 44 и новой линией, GPSC которой не определён, серотип 23F — GPSC7 и GPSC49, серотип 15B — GPSC11 и GPSC229. Невакцинные серотипы экспрессировались линиями GPSC 365 (серотип 28A), GPSC177 (серотип 35F), GPSC212 (серотип 15F), GPSC229 (серотип 15C), GPSC123 (серотип 37), GPSC38 (серотип 38), GPSC230 (серотип 13).

Чувствительность к антимикробным препаратам инвазивных изолятов *S. pneumoniae*

Анализ чувствительности к АМП показал, что резистентны к пенициллину были 6 (9%) инвазивных изолятов (**табл. 2**), к тетрациклину — 11 (16%), к эритромицину — 5 (7%), к клиндамицину — 2 (3%), к респираторным фторхинолонам — 1 (1%). К триметоприму-сульфаметоксазолу 12 (18%) изолятов были резистентны, 12 (18%) — чувствительны при увеличенной экспозиции. Среди изолятов 28 линий GPSC изоляты 5 линий, экспрессирующие вакцинные серотипы, были резистентны одновременно к 3 и более классам АМП: GPSC1 (серотип 19F), GPSC6 (серотип 14) были резистентны к пенициллину, тетрациклину, три-

метоприму-сульфаметоксазолу, эритромицину и клиндамицину; GPSC10 (серотип 19F), GPSC904;9 (серотип 14) — к пенициллину, тетрациклину и триметоприму-сульфаметоксазолу, GPSC6 (серотип 6E(B)) — к пенициллину, эритромицину и триметоприму-сульфаметоксазолу. Одна линия с вакцинными серотипами была резистентна одновременно к антибиотикам двух классов: GPSC44 (серотип 19F) — к тетрациклину и эритромицину. Две линии, экспрессирующие невакцинные серотипы, — GPSC177 (серотип 35F) и GPSC230 (серотип 13) — были резистентны к тетрациклину и триметоприму-сульфаметоксазолу.

Генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам

У клинических изолятов *S. pneumoniae* резистентность к β -лактамам в первую очередь обусловлена вариациями аминокислотных последовательностей в транспептидазных доменах ПСБ: PBP1a, PBP2b и PBP2x, которые снижают сродство β -лактамов антибиотиков к этим участкам. Тип ПСБ позволяет прогнозировать уровни резистентности к β -лактамам [13]. Анализ результатов полногеномного секвенирования инвазивных изолятов *S. pneumoniae* выявил, что наиболее распространённым типом ПСБ у чувствительных изолятов (PBP1a-PBP2b-PBP2x) был 2-0-2 — 29%, реже встречались 11-4-0 — 4% и 12-0-6 — 3%. Все резистентные к пенициллину изоляты имели сигнатуры: 13-16-47, 17-15-22, 24-53-77, 36-34-44, 31-12-18. Выявлено также несколько комбинаций новых типов ПСБ: new-27-new, 34-11-new. Резистентность к макролидам и линкозамидам (эритромицину и клиндамицину) была обусловлена

Таблица 2. Резистентность пневмококковых линий GPSC к АМП

Пневмококковые линии	Серотип	Количество	Генотип, резистентность, n (%)						
			PEN	TET	TS	CL	ERY	CHL	FX
1	19F	2	2 (3)	2 (3)	2 (3)	1 (1)	2 (3)	0	0
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	11A	1	0	0	1 (1)	0	0	0	0
6	6E(B),14	2	1 (1)	2 (3)	2 (3)	2 (3)	2 (3)	0	0
7	23F	4	0	0	4 (6)	0	0	0	0
10	19F	1	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0
11	15B	2	0	0	2 (3)	0	0	0	0
12	3	12	0	1 (1)	0	0	0	0	1 (1)
13	6A, 6B	2	1 (1)	1 (1)	2 (3)	0	1 (1)	0	0
16	9N	2	0	0	1 (4)	0	0	0	1 (1)
19	22F	2	0	0	0	0	0	0	0
32	7F,8	4	0	0	0	0	0	0	0
38	38	1	0	0	0	0	0	0	0
43	9V	3	0	0	3 (4)	0	0	0	0
44	19F	1	0	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0	0
49	23F	1	0	0	1 (1)	0	0	0	0
68	18C	2	0	0	2 (3)	0	0	0	0
76	6A	1	0	0	1 (1)	0	0	0	0
98	8	1	0	0	0	0	0	0	0
123	37	1	0	0	0	0	0	0	0
162	4	2	0	0	0	0	0	0	0
177	35F	2	0	2 (3)	2 (3)	0	0	0	0
212	12F, 15F	4	0	0	0	0	0	0	0
229	15B, 15C	3	0	0	3 (4)	0	0	0	0
230	13	1	0	1 (1)	1 (1)	0	1 (1)	0	0
365	28A	2	0	0	0	0	0	0	0
376	6E(6B)	1	0	0	1 (1)	0	0	1 (4)	0
904;9	14	1	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0
Not assigned	10C, 19F, 8, 10A, 4	6	0	2 (3)	2 (3)	0	0	0	0
28	27	68	6 (9)	14 (21)	33 (49)	4 (6)	7 (10)	1 (1)	2 (3)

Примечание. PEN — резистентность к пенициллину, предсказанная на основе последовательностей RBP1a, RBP2b и RBP2x; TET — резистентность к тетрациклину, предсказанная по наличию гена *tet M*; TS — резистентность к триметоприму-сульфаметоксазолу, связана с заменой в *folA 1100L* и/или вставкой 1 или 2 кодонов в *folP_aa_insert_57-70*, CL — резистентность к клиндамицину, предсказанная по наличию гена *ermB*; ERY — резистентность к макролидам, предсказанная по наличию гена метилазы (*ermB*) и гена насоса оттока макролидов (*mefA/E*); CHL — резистентность к хлорамфениколу, предсказанная по наличию гена хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*); FX — резистентность к фторхинолонам, предсказанная по наличию мутаций в генах *gyrA*, *parC*.

наличием гена метилазы (*ermB*) у 5 (7%) изолятов, у 1 (1%) изолята были одновременно обнаружены гены *ermB* и гены насоса оттока макролидов (*mefA/E*). Резистентность к триметоприму-сульфаметоксазолу была связана с заменой в *folA 1100L* и/или вставкой 1 или 2 кодонов *foP*, в то время как у изолятов, относящихся к категории чувствительных при повышенной экспозиции, часто имела место вставка 1 или 2 кодонов в *folP*. Резистентность к хлорамфениколу прогнозировалась по наличию гена хлорамфе-

никацетилтрансферазы (*cat*), резистентность к фторхинолонам — мутациями в генах *gyrA* и *parC*.

Сравнение фенотипа и генотипа резистентности

Конкордантность генотипа и фенотипа резистентности в целом была высокой, однако в некоторых случаях были выявлены несоответствия между генотипической и фенотипической резистентностью.

Резистентность к β-лактамам показала хорошее соответствие. Шесть изолятов пневмококков,

резистентных к пенициллину, имели сигнатуры ПСБ, характерные для резистентных пневмококков. Интересно, что все 6 резистентных к пенициллину изолятов имели сигнатуры РВР1а(13–36)-РВР2b(12–53)-РВР2х(18–77), в то время как все чувствительные изоляты имели сигнатуры ПСБ с низким номером. Таким образом, сигнатуры транспептидазы ПСБ являются надёжными индикаторами МПК различных β-лактамовых антибиотиков у клинических изолятов пневмококков и могут служить альтернативой тестированию фенотипической чувствительности.

Все 11 резистентных к тетрациклину пневмококков несли гены *tetM*. Три изолята, содержавшие *tetM*, относились к категории чувствительных, что может быть обусловлено мутациями в *tetM*, не рассмотренными в нашем исследовании.

В случае с триметопримом-сульфаметоксазолом для большинства изолятов была выявлена хорошая корреляция между наличием маркеров резистентности и фенотипической резистентностью. Двенадцать изолятов являлись двойными мутантами с заменой в *folA I100L* и вставкой 1 или 2 кодонов в *folP aa insert 57–70* и были резистентны к триметоприму-сульфаметоксазолу (табл. 2). Двенадцать изолятов пневмококка, содержащие вставки в *folP*, имели МПК 2 мг/л и были отнесены к категории чувствительных при увеличенной экспозиции, а 9 изолятов с одиночными мутациями в *folP* были отнесены к категории чувствительных (МПК ≤ 1 мг/л).

Все 5 изолятов, резистентных к эритромицину, несли ген *ermB*, 1 резистентный изолят нёс одновременно *ermB* и *mefA*, в то же время 2 изолята, имевшие ген *mefA*, сохраняли фенотипическую чувствительность к эритромицину. У 2 изолятов, резистентных к клиндамицину, были обнаружены гены *ermB*, но *ermB* был выявлен также у 2 фенотипически чувствительных изолятов.

В связи с тем, что для *S. pneumoniae* отсутствуют критерии для определения категории чувст-

вительности к хлорамфениколу, оценка активности данного препарата проводилась на основании значения эпидемиологических точек отсечения (Epidemiological cut-off value). МПК хлорамфеникола для всех исследованных изолятов составила менее 8 мг/л, что соответствует популяции дикого типа), однако 1 изолят нёс ген *cat*.

Был выявлен 1 изолят, резистентный к респираторным фторхинолонам (левофлоксацину и моксифлоксацину), он имел мутации в генах *gyrA* и *parC*. В то же время среди чувствительных к фторхинолонам пневмококков у 1 изолята была выявлена мутация в гене *parC*.

Генетические детерминанты вирулентности пневмококков

Чтобы получить представление о генетических особенностях, способствующих вирулентности, мы исследовали наличие основных белковых факторов вирулентности пневмококка. У всех инвазивных изолятов пневмококков были обнаружены холинсвязывающие белки (CbpG, LytA и Pse/CbpE), PavA и PfbA, известные как фибронектин- и плазминогенсвязывающие белки, а также гиалуронидаза, пневмолизин, нейраминидаза, связанный с капсулой Cps4A (табл. 3). Цинковая металлопротеиназа C была обнаружена у 9 (13%) изолятов.

Обсуждение

В нашем исследовании среди клинических изолятов, вызывающих менингит в России, преобладали пневмококки серотипа 3. Аналогичная ситуация отмечается и во многих других странах в поствакцинальный период. В Австрии, Англии, Канаде, Швеции и Германии за последние 3 года наблюдался значительный рост инвазивных пневмококковых заболеваний серотипа 3 у взрослых [14]. В Бразилии серотип 3 выступал как преобладающая причина инвазивного заболевания в эпоху после ПКВ среди взрослых [15, 16]. Низкая эффектив-

Таблица 3. Характеристика генов вирулентности

Гены вирулентности	Название кодируемого белка	% гомологии	Количество изолятов	
			<i>n</i>	%
<i>cbpG</i>	Холинсвязывающий белок G	99,30	68	100
<i>lytA</i>	Аутолизин	98,75	68	100
<i>pse/cbpE</i>	Холинсвязывающий белок E	99,18	68	100
<i>ply</i>	Пневмолизин	99,86	68	100
<i>pavA</i>	Фибронектинсвязывающий белок	99,52	68	100
<i>pfbA</i>	Плазмин- и фибронектинсвязывающий белок A	99,72	68	100
<i>hysA</i>	Гиалуронидаза	99,16	68	100
<i>nanA</i>	Нейраминидаза A	98,77	68	100
<i>cps4A</i>	Синтез капсулы	96,54	68	100
<i>zmpC</i>	Цинковая металлопротеиназа C	99,96	9	13

ность конъюгированных вакцин против пневмококков серотипа 3 связана с особенностями строения полисахаридной капсулы, которая нековалентно связана с пептидогликаном клеточной стенки [17–21]. Следует отметить, что изоляты линии GPSC12 (серотип 3), оставаясь основной причиной инвазивных форм пневмококковой инфекции во всём мире после введения ПКВ-13, как правило, сохраняют чувствительность к АМП [22–25]. Низкая частота резистентности к АМП изолятов серотипа 3 может быть связана с высокой инвазивностью изолятов данного серотипа и относительно короткой продолжительностью носительства, что, в свою очередь, снижает воздействие АМП при лечении инфекций другой этиологии [26]. В то же время исследование серотипа 3, проведённое в Англии [27], выявило, что с 2018 г. появляются изоляты линии GPSC12, резистентные к пенициллину, макролидам, хлорамфениколу и тетрациклину [28, 29]. Нарастание резистентности изолятов серотипа 3 указывает на циркуляцию более устойчивых к антибиотикам клонов [30]. В нашем исследовании все изоляты *S. pneumoniae* серотипа 3 были чувствительны к пенициллину, из 12 изолятов, выделенных из ликвора, только 2 содержали гены резистентности к фторхинолонам — *parC* и к тетрациклину — *tetM*, сохраняя при этом фенотипическую чувствительность к данным препаратам.

Вторыми по частоте выделения при менингите были пневмококки серотипа 19F, что может быть обусловлено особенностями капсульного полисахарида, который более устойчив к отложению С3b компонента комплемента и антител на стенке бактерии, что снижает чувствительность к опсонофагоцитозу [31, 32]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что циркуляция серотипа 19F связана с распространением 3 линий: GPSC10, GPSC1 и GPSC44. Все линии характеризовались устойчивостью к различным АМП, причём линии GPSC10 и GPSC1 проявляли множественную антимикробную резистентность. В Канаде доминирование серотипа 19F было связано с распространением линий GPSC1, GPSC4, GPSC9, GPSC10, GPSC18, GPSC44 и GPSC119 [33], в Швеции — линии GPSC1 [34], в Азии, Европе, Северной Америке и Южной Америке серотип 19F был одним из доминирующих в линии GPSC1 [35]. В Южной Африке доминирование серотипа 19F было связано с распространением линий GPSC1 и GPSC21, при этом установлено, что высокая, порядка 50%, внутрибольничная смертность от пневмококкового менингита связана с серотипом 19F [35, 36]. Увеличение частоты встречаемости серотипа 19F после введения ПКВ-13 в Индии было связано с мультирезистентными линиями GPSC1 и GPSC10, при этом особого внимания заслуживает линия GPSC10, которая экспрессировала как вакцинные серотипы,

включая 19F, так и невакцинные серотипы и тем самым вносила наибольший вклад в распространение невакцинных серотипов среди клинических изолятов [37]. Линия GPSC10 способна одновременно экспрессировать широкий спектр серотипов, что облегчает её адаптацию к селективному давлению вакцин. Международный набор данных линии GPSC10 показал, что эта линия экспрессирует 16 серотипов, из которых только 6 включены в ПКВ-13. При этом линия GPSC10 обладает относительно высоким потенциалом развития инвазивных форм инфекции и склонностью вызывать менингит, независимо от серотипа [38]. Было установлено, что для распространения пневмококков линии GPSC10 во Франции потребовалось порядка 3–5 лет, а в Испании, Аргентине и Израиле быстрое изменение состава серотипа этой линии произошло в поствакцинальный период. Таким образом, вместе с его трансмиссивностью GPSC10 следует рассматривать как линию высокого риска, которая со временем может снизить эффективность вакцин во всём мире [39, 40]. Е. Егоровой и соавт. установлено, что в России в 2011–2018 гг. изоляты серотипа 19F принадлежали к 8 различным линиям (GPSC1, GPSC44, GPSC10, GPSC6, GPSC11, GPSC18, GPSC43 и GPSC591), из них линии GPSC1, GPSC6 и GPSC10 характеризовались резистентностью к АМП [41].

По результатам настоящего исследования пневмококки серотипа 23F были третьими по распространённости среди серотипов, ответственных за развитие бактериального менингита в России. Четыре из 5 изолятов серотипа 23F принадлежали линии GPSC7, 1 — линии GPSC49. Все изоляты серотипа 23F характеризовались резистентностью к триметоприму-сульфаметоксазолу. В исследованиях, проведённых в Китае и Иране, серотип 23F был одним из доминирующих серотипов, выделенных у пациентов из ликвора [42, 43]. Результаты исследований, выполненных в Великобритании, показали, что изоляты серотипа 23F входили в линию GPSC7. Если в 2002 г. в этой линии преобладал серотип 23F и было лишь небольшое количество серотипа 23A, то в 2009 г. появились изоляты серотипа 23B [29]. Линия GPSC7 была одной из доминирующих линий, ответственных за инвазивные заболевания в эпоху ПКВ-13 в Гонконге, Израиле, Малави, Южной Африке, Гамбии и США [22].

Результаты международных исследований свидетельствуют о том, что поствакцинальный период характеризуется снижением доли вакцинных серотипов и увеличением невакцинных серотипов пневмококков среди разных возрастных групп населения [44, 45]. В популяции сохраняются линии, представленные вакцинными серотипами, в которых уже присутствовали невакцинные серотипы [15]. Отмечено, что эти невакцинные серотипы обладают высоким потенциалом развития инвазив-

ных форм инфекции [46, 47]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что в России более 17% случаев пневмококкового менингита были вызваны пневмококками невакцированных серотипов. Обращает на себя внимание относительно высокая доля изолятов с серотипом 15В (6%) и присутствие изолятов с невакцированными серотипами 28А, 37 и 38, которые ранее не были ассоциированы с пневмококковым менингитом на территории России. Установлено, что уровень резистентности к антибиотикам у невакцированных серотипов ниже, чем у вакцинных, и различается в зависимости от линии GPSC. В нашем исследовании линии, экспрессирующие невакцированные серотипы, были чувствительны ко всем тестируемым АМП, за исключением 2 линий (табл. 2).

В процессе инвазивной инфекции на разных стадиях участвуют различные факторы вирулентности. По результатам нашего исследования классические гены, кодирующие факторы вирулентности, такие как синтез капсулы, пневмококковый поверхностный адгезин, аутолизин, белок, связывающий фибронектин и пневмолизин, были обнаружены у всех инвазивных изолятов. Интересное наблюдение было сделано в отношении гена *zmpC*. Он был выявлен только у 9 инвазивных изолятов пневмококка линий GSPC229 (серотип 15С,15В), GSPC3 (серотип 11А), GSPC162 (серотип 4), GSPC904 (серотип 14) и новой линии GSPC (серотип 8). Ранее в исследовании в Нидерландах ген *zmpC* выявлен у инвазивных серотипов 8, 11А и 4, принадлежащих к линии GPSC3. Установлено, что случаи инвазивных пневмококковых инфекций, вызванные *zmpC*-положительными пневмококками, чаще сопровождались сепсисом [48]. Японскими учёными высказано предположение о том, что металлопротеаза цинка *zmpC* подавляет вирулентность пневмококков путём ингибирования бактериальной инвазии в центральную нервную систему [49]. Таким образом, металлопротеаза цинка *zmpC* представляет отдельный интерес и требует дополнительных исследований.

Выводы

1. Выявлено 28 глобальных кластеров пневмококковых последовательностей (GPSC), 45 сиквенс-типов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными штаммами, на территории России. Из 68 изолятов *S. pneumoniae*, выделенных у пациентов с бактериальным менингитом, более 17% относились к невакцированным серотипам.

2. Антибиотикорезистентность пневмококков вакцинных серотипов была выше, чем у невакцированных серотипов.

3. Появление линий невакцированных серотипов пневмококка с детерминантами высокой вирулентности, включая устойчивость к антибиотикам, об-

условливает необходимость дальнейших исследований молекулярно-генетической характеристики изолятов, вызывающих менингит.

4. Результаты сопоставления фенотипической и генотипической антимикробной резистентности характеризовались хорошей конкордантностью, что указывает на необходимость дальнейшего изучения возможности использования полногеномного секвенирования в качестве диагностического инструмента для выявления механизмов резистентности у клинических изолятов *S. pneumoniae*.

В заключение следует отметить, что характеристика пневмококковых линий, их генетические вариации, оказывающие влияние на резистентность и инвазивность, являются весьма информативными для создания глобальной стратегии непрерывного эпидемиологического контроля за популяцией пневмококков.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Principi N., Di Cara G., Bizzari I., et al. Prevention of invasive pneumococcal disease: problems emerged after some years of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine use. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2018;20(1):1. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0607-z>
- Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R., et al. Pneumococcal vaccines. *Microbiol. Spectr.* 2019;7(6):10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018>
- Chen H., Matsumoto H., Horita N., et al. Prognostic factors for mortality in invasive pneumococcal disease in adults: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2021;11(1):11865. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91234-y>
- Ganaie F., Saad J.S., McGee L., et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *mBio.* 2020;11(3):e00937-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00937-20>
- Salvadori G., Junges R., Morrison D.A., Petersen F.C. Competence in *Streptococcus pneumoniae* and close commensal relatives: mechanisms and implications. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:94. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00094>
- Протасова И.Н., Бахарева Н.В., Перьянова О.В. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика и резистентность пневмококков у детей дошкольного возраста. *Сибирское медицинское обозрение.* 2018;(3):73–9. Protasova I.N., Bakhareva N.V., Peryanova O.V., et al. Molecular-epidemiological characteristics and resistance of pneumococcus in children of preschool age. *Siberian Medical Review.* 2018;(3):73–9. DOI: <https://doi.org/10.20333/2500136-2018-3-73-79> EDN: <https://elibrary.ru/xserud>
- Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y., et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;96(1):114914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914>
- Протасова И.Н., Мартынова Г.П., Ильенкова Н.А. и др. Этиологическая роль и молекулярно-генетические особенности *Streptococcus pneumoniae* при инфекционных заболеваниях у детей. *Детские инфекции.* 2020;19(1):7–12. DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-1-7-12> EDN: <https://elibrary.ru/dwibms>

9. Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И. и др. Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):512–8. Mironov K.O., Gaponova I.I., Korchagin V.I., et al. Antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(5):512–8. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-144> EDN: <https://elibrary.ru/kvjhkk>
10. Vohrnová S., Kozáková J. Possibilities for use of whole genome sequencing (WGS) for the analysis of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 2024;73(1):30–6. DOI: <https://doi.org/10.61568/emi/11-6254/20240123/136240> (in Czech)
11. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В. и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(3):230–7. Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhrukova M.V., et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «Pehasus 2014–2017». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(3):230–7. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237> EDN: <https://elibrary.ru/hlaxrl>
12. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В. и др. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(2):113–8. Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Yu.V., et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(2):113–8. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118> EDN: <https://elibrary.ru/lxmqxy>
13. Kawaguchiya M., Urushibara N., Aung M.S., et al. Genetic characterization of penicillin-binding proteins of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in the postpneumococcal conjugate vaccine era in Japan. *Int. J. Infect. Dis.* 2022;120:174–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.033>
14. Grant L.R., Slack M.P.E., Theilacker C., et al. Distribution of serotypes causing invasive pneumococcal disease in older adults from high-income countries and impact of pediatric and adult vaccination policies. *Vaccine*. 2023;41(38):5662–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.08.001>
15. Brandileone M.C.C., Almeida S.C.G., Minamisava R., Andrade A.L. Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of a 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine*. 2018;36(19):2559–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.010>
16. Almeida S.C.G., Cassiolato A.P., Dias U.J., et al. Molecular characterization of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated in pre (2005–2009) and post (2011–2015) 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Brazil. In: *37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases*. Ljubljana, Slovenia;2019.
17. Shenoy A.T., Beno S.M., Brissac T., et al. Severity and properties of cardiac damage caused by *Streptococcus pneumoniae* are strain dependent. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204032. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204032>
18. Andrews N., Kent A., Amin-Chowdhury Z., et al. Effectiveness of the seven-valent and thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccines in England: The indirect cohort design, 2006–2018. *Vaccine*. 2019;37(32):4491–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.071>
19. Wijayasri S., Hillier K., Lim GH., et al. The shifting epidemiology and serotype distribution of invasive pneumococcal disease in Ontario, Canada, 2007–2017. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226353. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226353>
20. Goettler D., Streng A., Kemmling D., et al. Increase in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 associated parapneumonic pleural effusion/empyema after the introduction of PCV13 in Germany. *Vaccine*. 2020;38(3):570–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.056>
21. Babb R., Doyle C.R., Pirofski L.A. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide 3. *Microbiol. Spectr*. 2021;9(3):e0144621. DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01446-21>
22. Lo SW., Gladstone RA., van Tonder AJ., et al. Pneumococcal lineages associated with serotype replacement and antibiotic resistance in childhood invasive pneumococcal disease in the post-PCV13 era: an international whole-genome sequencing study. *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(7):759–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30297-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30297-x)
23. Kandasamy R., Voysey M., Collins S., et al. Persistent circulation of vaccine serotypes and serotype replacement after 5 years of infant immunization with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the United Kingdom. *J. Infect. Dis.* 2020;221(8):1361–70. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz178>
24. Løchen A., Croucher N.J., Anderson R.M. Divergent serotype replacement trends and increasing diversity in pneumococcal disease in high-income settings reduce the benefit of expanding vaccine valency. *Sci. Rep.* 2020;10(1):18977. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75691>
25. Kwun M.J., Ion A.V., Cheng H.C., et al. Post-vaccine epidemiology of serotype 3 pneumococci identifies transformation inhibition through prophage-driven alteration of a non-coding RNA. *Genome Med.* 2022;14(1):144. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01147-2>
26. Butić I., Gužvinec M., Jelić M., et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates among Croatian adults during a fifteen-year period (2005–2019). *Croat. Med. J.* 2022;63(2):156–65. DOI: <https://doi.org/10.3325/cmj.2022.63.156>
27. Azarian T., Mitchell P.K., Georgieva M., et al. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci. *PLoS Pathog.* 2018;14(11):e1007438. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007438>
28. Sheppard C.L., Groves N., Andrews N., et al. The genomics of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates from UK children and their household contacts, pre-PCV7 to post-PCV13. *Genes (Basel)*. 2019;10(9):687. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10090687>
29. Groves N., Sheppard C.L., Litt D., et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in England and Wales: a major vaccine evader. *Genes (Basel)*. 2019;10(11):845. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10110845>
30. Suaya J.A., Mendes R.E., Sings R.E., et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution and antimicrobial nonsusceptibility trends among adults with pneumonia in the United States, 2009–2017. *J. Infect.* 2020;81(4):557–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.035>
31. Sanapala S.R., Seco B.M.S., Baek J.Y., et al. Chimeric oligosaccharide conjugate induces opsonic antibodies against *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A and 19F. *Chem. Sci.* 2020;11(28):7401–7. DOI: <https://doi.org/10.1039/d0sc02230f>

32. Downs S.L., Olwagen C.P., Van Der Merwe L., et al. *Streptococcus pneumoniae* and other bacterial nasopharyngeal colonization seven years post-introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in South African children. *Int. J. Infect. Dis.* 2023;134: 45–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.05.016>
33. Golden A.R., Adam H.J., Baxter M., et al. Whole genome characterization of *Streptococcus pneumoniae* from respiratory and blood cultures collected from Canadian hospitals before and after PCV-13 implementation in Canada: Focus on serotypes 22F and 33F from CANWARD 2007–2018. *Vaccine.* 2021;39(39): 5474–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.061>
34. Yamba Yamba L., Udden F., Fuursted K., et al. Extensive/multidrug-resistant pneumococci detected in clinical respiratory tract samples in Southern Sweden are closely related to international multidrug-resistant lineages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:824449. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.824449>
35. Gladstone R.A., Lo S.W., Lees J.A., et al. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact. *EBioMedicine.* 2019;43:338–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.021>
36. Lekhuleni C., Ndlangisa K., Gladstone R.A., et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease-causing lineages among South African children. *Nat. Commun.* 2024;15(1):8401. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52459-3>
37. Nagaraj G., Govindan V., Ganaie F., et al. *Streptococcus pneumoniae* genomic datasets from an Indian population describing pre-vaccine evolutionary epidemiology using a whole genome sequencing approach. *Microb. Genom.* 2021;7(9):000645. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000645>
38. Lo S.W., Gladstone R.A., van Tonder A.J., et al. A mosaic tetracycline resistance gene tet(S/M) detected in an MDR pneumococcal CC230 lineage that underwent capsular switching in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(3):512–20. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz477>
39. Gagetti P., Lo S.W., Hawkins P.A., et al. Population genetic structure, serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in Argentina. *Microb. Genom.* 2021;7(9):000636. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000636>
40. Lo S.W., Mellor K., Cohen R., Alonso A.R. Emergence of a multidrug-resistant and virulent *Streptococcus pneumoniae* lineage mediates serotype replacement after PCV13: an international whole-genome sequencing study. *Lancet Microbe.* 2022;3(10):e735–43. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00158-6](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00158-6)
41. Egorova E., Kumar N., Gladstone R.A., et al. Key features of pneumococcal isolates recovered in Central and Northwestern Russia in 2011–2018 determined through whole-genome sequencing. *Microb. Genom.* 2022;8(9):mgen000851. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000851>
42. Beheshti M., Jabalameli F., Feizabadi M.M., et al. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated from clinical samples in Tehran, Iran. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):167. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01855-y>
43. Zhou M., Wang L., Wang Z., et al. Molecular characterization of penicillin-binding protein 2x, 2b and 1a of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal diseases in China: a multicenter study. *Front. Microbiol.* 2022;13:838790. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838790>
44. Ouldali N., Varon E., Levy C., et al. Invasive pneumococcal disease incidence in children and adults in France during the pneumococcal conjugate vaccine era: an interrupted time-series analysis of data from a 17-year national prospective surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 2021;21(1):137–47. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30165-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30165-1)
45. Andrejko K., Ratnasiri B., Lewnard J.A. Association of pneumococcal serotype with susceptibility to antimicrobial drugs: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2022;75(1):131–40. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab852>
46. Balsells E., Dagan R., Yildirim I., et al. The relative invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* among children after PCV introduction: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2018;77(5):368–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.004>
47. Amin-Chowdhury Z., Collins S., Sheppard C., et al. Characteristics of invasive pneumococcal disease caused by emerging serotypes after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in England: a prospective observational cohort study, 2014–2018. *Clin. Infect. Dis.* 2020;71(8):e235–43. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa043>
48. Hansen C.B., Fuursted K., Valentiner-Branth P., et al. Molecular characterization and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8 in Denmark. *BMC Infect. Dis.* 2021;21(1):421. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06103-w>
49. Yamaguchi M. Investigation of pneumococcal virulence factors in the infection process. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 2020;75(2): 173–83. DOI: <https://doi.org/10.3412/jsb.75.173> (in Japanese)

Информация об авторах

Чагарян Аида Нуримановна — канд. биол. наук, н. с. лаб. антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, aida.chagaryan@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Иванчик Натали Владимировна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, natali.ivanchik@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Кузьменков Алексей Юрьевич — д-р мед. наук, профессор каф. микробиологии, зам. директора по стратегическим разработкам НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, alexey.kuzmenkov@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9562-2096>

Козлов Роман Сергеевич — д-р мед. наук, профессор, ректор, директор НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, roman.kozlov@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Гапонова Ирина Игоревна — лаборант-исследователь научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, gaponova@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0003-4481-2249>

Information about the authors

Aida N. Chagaryan — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of antibiotic resistance, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, aida.chagaryan@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Natali V. Ivanchik — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of antibiotic resistance, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, natali.ivanchik@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Alexey Yu. Kuzmenkov — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy director, Associate Professor, Microbiology department, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, alexey.kuzmenkov@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9562-2096>

Roman S. Kozlov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Chancellor, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, roman.kozlov@antibiotic.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Irina I. Gaponova — research laboratory assistant, Scientific group for the development of new methods for detecting genetic polymorphisms, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, gaponova@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0003-4481-2249>

Миронов Константин Олегович — д-р мед. наук, рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Участие авторов: *Чагарян А.Н.* — организация сбора и обработки материала, идентификация микроорганизмов фенотипическими методами, определение чувствительности к АМП, написание текста; *Иванчик Н.В.* — организация сбора материала, идентификация микроорганизмов фенотипическими методами, определение чувствительности к АМП; *Кузьменков А.Ю.* — обработка материала; *Козлов Р.С.* — координация исследования, редактирование статьи; *Гапонова И.И.* — проведение полногеномного секвенирования, обработка полученных результатов; *Миронов К.О.* — проведение полногеномного секвенирования, обработка полученных результатов, 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 30.12.2024;
принята к публикации 17.03.2025;
опубликована 28.04.2025

Konstantin O. Mironov — D. Sci. (Med.), Head, Group for the development of new methods for detecting genetic polymorphisms, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Author contribution: *Chagaryan A.N.* — organization of material collection and processing, identification of microorganisms by phenotypic methods, determination of sensitivity to AMP, text writing; *Ivanchik N.V.* — organization of material collection, identification of microorganisms by phenotypic methods, determination of sensitivity to AMP; *Kuzmenkov A.Yu.* — material processing; *Kozlov R.S.* — coordination of the study, editing of the article; *Gaponova I.I.* — full genome sequencing, processing of the obtained results; *Mironov K.O.* — full genome sequencing, processing of the obtained results, editing of 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 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 30.12.2024;
accepted for publication 17.03.2025;
published 28.04.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-631>



Гуморальный иммунитет к адгезинам и токсинам возбудителя коклюша у мышей, иммунизированных экспериментальными бесклеточными коклюшными вакцинами из биоплёночной и планктонной культур *Bordetella pertussis*

Зайцев Е.М. , Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Зайцев А.Е.

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

Аннотация

Введение. Коклюш остаётся актуальной проблемой здравоохранения во всём мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации, где начиная с 1990-х гг. отмечается рост заболеваемости коклюшем, увеличение тяжести течения заболевания и летальности. В этой ситуации требуется создание нового поколения бесклеточных коклюшных вакцин (БКВ), способных более эффективно влиять на колонизацию, персистенцию и передачу *Bordetella pertussis*. Одним из возможных направлений совершенствования вакцинопрофилактики коклюшной инфекции является создание БКВ на основе протективных антигенов, выделенных из биоплёночных культур *B. pertussis*.

Цель работы — исследование уровня IgG-антител к антигенам возбудителя коклюша: адгезинам — филаментозному гемагглютину (ФГА), пертактину (ПРН) и токсинам — коклюшному токсину (КТ), липополисахариду (ЛПС) у мышей, иммунизированных экспериментальными БКВ на основе антигенных комплексов, выделенных из биоплёночных и планктонных культур *B. pertussis*.

Материалы и методы. В опытах использовали экспериментальные БКВ на основе антигенных комплексов, выделенных из среды культивирования биоплёночной (БКВ-Б) и планктонной (БКВ-П) культур штамма *B. pertussis* № 317 (серовар 1.2.3). Титры IgG-антител к КТ, ФГА, ПРН и ЛПС в сыворотках крови мышей, иммунизированных БКВ-Б и БКВ-П, определяли в иммуноферментном анализе.

Результаты. Титры IgG-антител к адгезинам (ФГА и ПРН) в группе БКВ-Б были выше в 8 и 4 раза соответственно по сравнению с БКВ-П, при отсутствии значимых различий по титрам IgG-антител к КТ и ЛПС.

Заключение. Более высокая, по сравнению с БКВ-П, способность БКВ-Б индуцировать иммунный ответ к адгезинам *B. pertussis* при отсутствии существенных различий между ними в стимуляции IgG-антител к токсинам, указывает на преимущество использования антигенных комплексов из биоплёночных культур для создания БКВ нового типа.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин, липополисахарид, биоплёнки, планктонные культуры, электрофорез, IgG-антитела, иммуноферментный анализ

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 Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 15 от 25.12.2024).

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: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Зайцев А.Е. Гуморальный иммунитет к адгезинам и токсинам возбудителя коклюша у мышей, иммунизированных экспериментальными бесклеточными коклюшными вакцинами из биоплёночной и планктонной культур *Bordetella pertussis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):162–167.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-631>

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

Humoral immunity to adhesins and toxins of the pertussis pathogen in mice immunized with experimental acellular pertussis vaccines from biofilm and planktonic cultures of *Bordetella pertussis*

Evgeny M. Zaitsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Anton E. Zaitsev

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

Abstract

Introduction. Whooping cough remains an urgent health problem worldwide, including in countries with high vaccination rates, where, since the 1990s, there has been an increase in the incidence of whooping cough, an increase in the severity of the disease and mortality. In this situation, it is necessary to create a new generation of acellular pertussis vaccines (aPV) that can more effectively affect the colonization, persistence and transmission of *Bordetella pertussis*. One of the possible directions for improving the vaccine prophylaxis of pertussis infection is the creation of aPV based on protective antigens isolated from biofilm cultures of *B. pertussis*.

The aim of the study was to research the level of IgG antibodies to the antigens of the pertussis pathogen: adhesins — filamentous hemagglutinin (FHA), pertactin (PRN) and toxins — pertussis toxin (PT), lipopolysaccharide (LPS) in mice immunized with experimental aPV based on antigenic complexes (AC) isolated from biofilm and planktonic cultures of *B. pertussis*.

Materials and methods. Experimental aPV based on AC isolated from the culture medium of biofilm (aPV-B) and planktonic (aPV-P) cultures of *B. pertussis* strain No. 317 (serotype 1.2.3) were used in the experiments. IgG titers of antibodies to PT, FHA, PRN and LPS in blood sera of mice immunized with aPV-B and aPV-P was determined in ELISA.

Results. The titers of IgG antibodies to adhesins (FHA and PRN) in the aPV-B group were 8 and 4 times higher, respectively, compared with aPV-P, in the absence of significant differences in the titers of IgG antibodies to PT and LPS.

Conclusion. The higher ability of aPV-B to induce an immune response to *B. pertussis* adhesins compared to aPV-P, in the absence of significant differences between them in stimulating IgG antibodies to toxins, indicates the advantage of using antigenic complexes from biofilm cultures to create aPV of a new type.

Keywords: *Bordetella pertussis*, pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, pertactin, lipopolysaccharide, biofilms, planktonic cultures, electrophoresis, IgG antibodies, enzyme immunoassay.

Ethics 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 Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera (protocol No. 15, December 25, 2024).

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: Zaitsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Zaitsev A.E. Humoral immunity to adhesins and toxins of the pertussis pathogen in mice immunized with experimental acellular pertussis vaccines from biofilm and planktonic cultures of *Bordetella pertussis*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):162–167.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-631>

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

Введение

Коклюш остаётся актуальной проблемой здравоохранения во всём мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации, где начиная с 1990-х гг. отмечается рост заболеваемости коклюшем, увеличение тяжести течения заболевания и летальности, в том числе среди привитых детей, подростков, взрослых [1, 2]. Продолжающаяся циркуляцию вирулентных штаммов *Bordetella pertussis* среди населения связывают с переходом от цельноклеточных вакцин к бесклеточным коклюш-

ным вакцинам (БКВ). БКВ обеспечивают защиту привитых от тяжёлых форм коклюша, однако про- тивный иммунитет быстро снижается и не предотвращает колонизацию респираторного тракта и передачу возбудителя, стёртых форм заболевания и бессимптомного носительства. Известные в настоящее время БКВ содержат от 1 до 5 антигенов, полученных из планктонных культур *B. pertussis*: коклюшный токсин (КТ) и адгезины: филаментозный гемагглютинин (ФГА), пертактин (ПРН), антигены фимбрий Fim2 и Fim3. В качестве одной из вероят-

ных причин низкой эффективности известных БКВ является их неспособность влиять на формирование биоплёночных форм *B. pertussis* в респираторном тракте [3]. Образование биоплёнок штаммами *B. pertussis* в респираторном тракте играет важную роль в патогенезе коклюшной инфекции, повышая вирулентность и персистенцию *B. pertussis*. Биоплёнки *B. pertussis* отличаются от планктонных культур изменённым спектром экспрессии генов и уровнем продукции целого ряда белков, в том числе адгезинов и токсинов. В связи с этим вакцинные препараты из антигенов биоплёночных и планктонных культур могут различаться по иммуногенной активности [4].

В этой ситуации требуется создание нового поколения БКВ, способных более эффективно влиять на колонизацию, персистенцию и передачу *B. pertussis*. Одним из возможных направлений совершенствования вакцинопрофилактики коклюшной инфекции является создание БКВ на основе протективных антигенов, выделенных из биоплёночных культур *B. pertussis* [5–8].

Ранее нами было показано, что протективная активность БКВ из биоплёночной культуры (БКВ-Б) была в 2,5 раза выше, чем БКВ из планктонной культуры (БКВ-П), при интрацеребральном заражении мышей вирулентным штаммом *B. pertussis* [9]. БКВ-Б также более эффективно снижала уровень колонизации микробными клетками *B. pertussis* лёгких мышей при интраназальном заражении вирулентным штаммом.

Цель работы — исследование уровня IgG антител к адгезинам и токсинам возбудителя коклюша у мышей, иммунизированных экспериментальными БКВ на основе антигенных комплексов, выделенных из биоплёночных и планктонных культур *B. pertussis*.

Материалы и методы

В работе использован штамм *B. pertussis* № 317 (серовар 1.2.3), выделенный в России от больного коклюшем в 2003 г., депонирован в Научном центре экспертизы средств медицинского применения 15.09.2017, патент на изобретение № 2689903.

Мыши-гибриды F_1 (СВА×С57Bl6) массой 12–14 г получены из питомника «Андреевка» Московской области. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). 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 Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 15 от 25.12.2024).

Контроль морфологических, серологических и культуральных свойств штамма *B. pertussis* № 317 проводили в соответствии с Методическими указаниями¹. Культивирование штамма в жидкой синтетической питательной среде, выделение антигенных комплексов (АК) из планктонной и биоплёночных культур осуществляли в соответствии с ранее описанным методом [10]. Для характеристики состава АК из биоплёночной и планктонной культур использовали вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по Лэммли [11]. Электрофорез проводили в 10% трис-глициновом буфере при силе тока 25 мА. По окончании процесса гель окрашивали с помощью Кумасси бриллиантового синего R-250, после чего отмывали его дважды в водном растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 35% этанола.

Обезвреживание (детоксикацию) антигенных комплексов *B. pertussis* проводили формалином до концентрации 0,4% с добавлением сахарозы (10%) в течение 20 сут при периодическом встряхивании при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Для получения БКВ антигенные комплексы сорбировали на 2% геле алюминия гидроксида («InvivoGen») в таком соотношении, чтобы в 1 мл смеси содержалось 50 мкг белка, 0,3 мг алюминия гидроксида и ФСБ до 1 мл [10]. Для изучения уровня и динамики IgG-антител к КТ, ПРН, ФГА и липополисахариду (ЛПС) (все — National Institute for Biological Standards and Control) мышей линии F_1 (СВА×С57Bl6) массой 12–14 г иммунизировали внутривентриально ($n = 20$ в каждой группе) трёхкратно с интервалом 7 дней экспериментальными БКВ в дозе 25 мкг. Кровь брали у мышей на 7, 14, 21 и 28-е сутки после последней иммунизации. Забор крови (тотальный) у мышей проводили под эфирным наркозом.

Уровень IgG-антител в сыворотках иммунизированных мышей выявляли в иммуноферментном анализе. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки интактных мышей ($n = 5$). Концентрация антигенов для адсорбции на планшетах составляла: КТ — 2 мкг/мл; ФГА — 2 мкг/мл; ПРН — 2 мкг/мл; ЛПС — 2,5 мкг/мл. В опытах использовали пероксидазный антивидовой конъюгат к IgG мыши («Invitrogen») и тетраметилбензидин в качестве субстратной смеси. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра вертикального сканирования «Multiskan» («Thermo Scientific») при длине волны 450 нм. За титр сывороток принимали величины, обратные их максимальным разведениям, при которых значения оптической плотности (ОП) в 2 и более раз превышали значения ОП в лунках с отрицательным контролем.

¹ Методические указания МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009. 43 с.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Office Excel». Количественные данные представлены в виде $M \pm m$. Сравнения проводили по критерию t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Из среды культивирования биоплёночной и планктонной культур штамма № 317 были выделены АК, на основе которых были изготовлены два варианта БКВ: БКВ-Б и БКВ-П.

Результаты анализа необезвреженных и не адсорбированных на геле гидроксида алюминия АК, выделенных из биоплёночной и планктонной культур штамма № 317 в электрофорезе в ПААГ, пред-

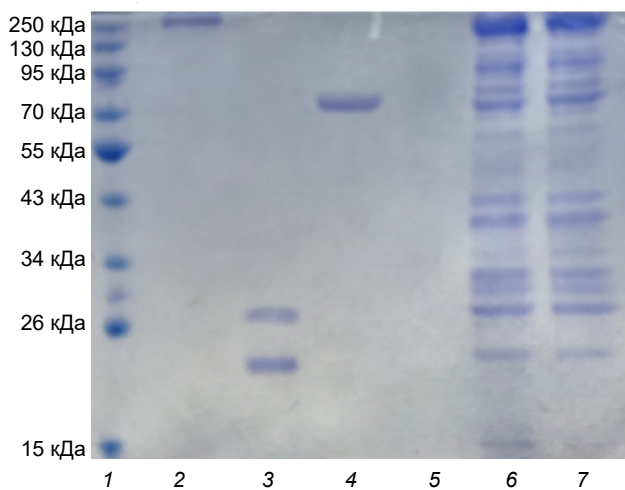


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ из антигенных комплексов биоплёночной и планктонной культур *B. pertussis*.

1 — маркеры молекулярной массы; 2 — ФГА; 3 — КТ; 4 — ПРН; 5 — ЛПС; 6 — АК штамма № 317 (биоплёночная культура); 7 — АК штамма № 317 (планктонная культура).

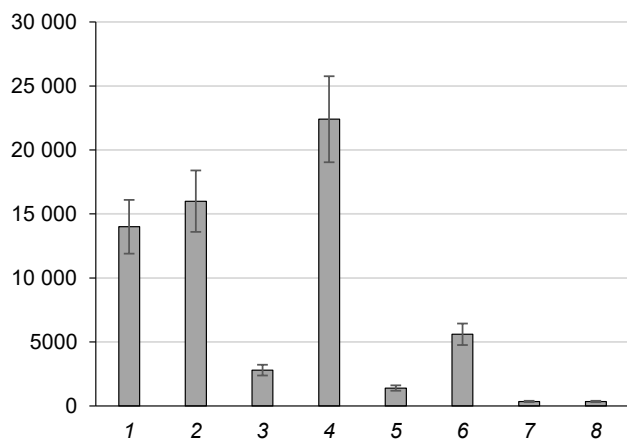


Рис. 2. Максимальные титры IgG-антител к антигенам *B. pertussis* у мышей, иммунизированных БКВ-Б и БКВ-П.

По оси ординат: титры антител. 1 — КТ БКВ-П; 2 — КТ БКВ-Б; 3 — ФГА БКВ-П; 4 — ФГА БКВ-Б; 5 — ПРН БКВ-П; 6 — ПРН БКВ-Б; 7 — ЛПС БКВ-П; 8 — ЛПС БКВ-Б. Титры IgG-антител у интактных мышей ≤ 100 .

ставлены на **рис. 1**. В составе АК штамма № 317 были обнаружены белки в диапазоне молекулярных масс от 15 до 220–250 кДа. При этом интенсивность белковых полос с молекулярной массой 15 кДа была выше у АК из биоплёночной культуры по сравнению с АК из планктонной культуры. В составе обоих препаратов были выявлены ФГА (220 кДа), ПРН (69 кДа), а также белки с молекулярной массой около 28 кДа, менее 26 кДа и более 15 кДа, соответствующие фрагментам КТ. На дорожке с ЛПС не обнаружено белковых компонентов, что указывает на иммунохимическую чистоту использованного препарата.

Результаты определения уровня IgG-антител к КТ, ПРН, ФГА и ЛПС у мышей, иммунизированных БКВ из биоплёночной и планктонной культур *B. pertussis*, представлены на **рис. 2**. Титры IgG-антител к КТ в обеих группах на 21-е сутки достигли максимальных значений с последующим снижением на 28-е сутки. Различия в титрах IgG-антител к КТ в группах БКВ-Б и БКВ-П были статистически недостоверными. Максимальные титры IgG-антител к ПРН в группе БКВ-Б были отмечены на 14-е и 21-е сутки, а в группе БКВ-П — на 14-е сутки с последующим снижением в обеих группах. При этом титры IgG-антител к ПРН в группе БКВ-Б были достоверно выше, чем в группе БКВ-П. Титры IgG-антител к ФГА в группах БКА-Б и БКВ-П последовательно нарастали и достигли максимальных значений на 21-е сутки. Далее было отмечено снижение титров IgG-антител на 28-е сутки. Максимальные титры IgG-антител к ФГА и ПРН в группе БКВ-Б были в 8 и 4 раза соответственно выше, чем в группе БКВ-П. Максимальные титры IgG-антител к ЛПС в группе БКВ-Б были отмечены на 14-е сутки, а в группе БКВ-П — на 21-е сутки с последующим снижением. Различия в титрах IgG-антител к ЛПС в обеих группах были статистически недостоверными.

Обсуждение

B. pertussis продуцирует ряд вирулентных факторов, определяющих патогенетический механизм коклюшной инфекции. Условно их можно разделить на адгезины (фимбрии, ПРН, фактор колонизации трахеи, ФГА) и токсины (КТ, аденилатциклаза, трахеальный цитотоксин, дермoneкротический токсин, ЛПС (эндотоксин)). Адгезины обеспечивают фиксацию возбудителя на клетках эпителия респираторного тракта, а токсины оказывают непосредственное повреждающее действие. Основным адгезином *B. pertussis* является ФГА, представляющий собой белок с молекулярной массой 220 кДа, не ассоциированный с фимбриями [12]. ПРН представляет собой связанный с наружной мембраной микробной клетки нефимбриальный белок (69 кДа). ПРН не обладает токсическими свойствами и по своему патогенетическому действию является ад-

гезином, а также обладает иммуномодулирующей активностью [13, 14].

КТ является одним из основных факторов патогенности *B. pertussis*, вызывает различные биологические эффекты *in vivo* и *in vitro* и обуславливает значительную часть симптомов заболевания у больных коклюшем. КТ является экзотоксином, секретуемым микробной клеткой, и представляет собой белок с молекулярной массой 117 кДа, состоящий из 5 структурных единиц (S1, S2, S3, S4 и S5), молекулярные массы которых варьируют от 28 кДа для S1 до 9,3 кДа для S5 [15, 16].

ЛПС является компонентом наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных бактерий, в том числе *B. pertussis*. Молекулы ЛПС обеспечивают структурную целостность бактериальной клетки, защищают мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. С ЛПС *B. pertussis* преимущественно связывают побочные эффекты цельноклеточных коклюшных вакцин [17, 18].

В связи с генотипическим и фенотипическим полиморфизмом, а также в зависимости от условий культивирования (биооплёночные или планктонные культуры), штаммы *B. pertussis* могут различаться по уровням продукции КТ, ФГА, ПРН и других антигенов. Биооплётки *B. pertussis* формируются в результате сложного координированного взаимодействия микробных клеток с биотическими и абиотическими субстратами. В биооплётных культурах увеличивается экспрессия адгезинов, что способствует прикреплению к субстрату и межклеточным взаимодействиям.

Нами исследован состав АК из планктонной и биооплётной культур *B. pertussis* и уровень IgG-антител к адгезинам (ПРН, ФГА) и токсинам КТ и ЛПС (эндотоксину) у мышей, иммунизированных БКВ из планктонной и биооплётной культур *B. pertussis* штамма № 317. По данным электрофореза в ПААГ, исследованные АК имели в своём составе ФГА, ПРН и фрагменты КТ — основные протективные антигены *B. pertussis*, входящие в состав БКВ. В целом электрофореграммы обеих препаратов были практически идентичными, за исключением большей интенсивности белковых полос с молекулярной массой около 15 кДа у БКВ-Б. Нарастание титров IgG-антител к КТ, ФГА и ПРН было обнаружено в сыворотках мышей, иммунизированных обеими препаратами, что подтверждает результаты электрофореза о наличии этих антигенов в составе БКВ. Динамика титров IgG-антител к КТ, ФГА, ПРН и ЛПС в группах БКВ-Б и БКВ-П в целом носила сходный характер с нарастанием титров антител, достижением максимальных значений и последующим снижением. При этом были выявлены существенные различия между БКВ-Б и БКВ-П по уровням антител к адгезинам ФГА и ПРН. Титры антител к ФГА и ПРН в группе БКВ-Б были

существенно выше, чем в группе БКВ-П, что можно объяснить различным удельным содержанием этих антигенов в составе БКВ, обусловленным более высоким уровнем продукции адгезинов биооплётной культурой или более высокой иммуногенностью ФГА и ПРН в составе БКВ-Б. Существенных различий между БКВ-Б и БКВ-П по титрам антител к КТ и ЛПС не выявлено.

Заключение

Более высокая, по сравнению с БКВ-П, способность БКВ-Б индуцировать иммунный ответ к адгезинам *B. pertussis*, обеспечивающих фиксацию возбудителя на клетках эпителия респираторного тракта, при отсутствии существенных различий между обеими препаратами в стимуляции IgG-антител к КТ, указывает на преимущество использования антигенных комплексов из биооплётных культур для создания более иммуногенных БКВ нового типа.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(5):492–502. Lomonosova A.V. Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(5):492–502. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11> EDN: <https://elibrary.ru/pdbbte>
2. Stefanelli P. Pertussis: identification, prevention and control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1183:127–36. DOI: https://doi.org/10.1007/5584_2019_408
3. Fullen A.R., Gutierrez-Ferman J.L., Yount K.S., et al. Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* resists antimicrobial peptides by functioning as a dual surface shield and decoy and converts *Escherichia coli* into a respiratory pathogen. *PLoS Pathog.* 2022;18(8):e1010764. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010764>
4. Suyama H., Luu L.D.W., Zhong L., et al. Integrating proteomic data with metabolic modeling provides insight into key pathways of *Bordetella pertussis* biofilms. *Front. Microbiol.* 2023;14:1169870. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1169870>
5. Fullen A.R., Gutierrez-Ferman J.L., Yount R.S., et al. Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* resists antimicrobial peptides by functioning as a dual surface shield and decoy and converts *Escherichia coli* into a respiratory pathogen. *PLoS Pathog.* 2022;18(8):e1010764. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010764>
6. Fullen A.R., Gutierrez-Ferman J.L., Rayner R.E., et al. Architecture and matrix assembly determinants of *Bordetella pertussis* biofilms on primary human airway epithelium. *PLoS Pathog.* 2023;19(2):e1011193. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011193>
7. Carriquiriborde F., Martin Aispuro P., Ambrosio N., et al. Pertussis vaccine candidate based on outer membrane vesicles derived from biofilm culture. *Front. Immunol.* 2021;12:730434. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730434>
8. Dorji D., Graham R.M., Singh A.K., et al. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell. Immunol.* 2019;337:42–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.006>

9. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Zaitsev A.E. Protective activity and safety of experimental acellular pertussis vaccines based on antigenic complexes isolated from biofilm and planktonic cultures of *Bordetella pertussis*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2024;177(3):349–52. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06187-9>
10. Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В. и др. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежeweделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(2):134–9. Zaitsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V., et al. Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(2):134–9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-134-139> EDN: <https://elibrary.ru/cqzssv>
11. 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>
12. Imani D., Bahadori T., Golsaz-Shirazi F., et al. High purity and recovery of native filamentous hemagglutinin (FHA) from *Bordetella pertussis* using affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2024;1239:124122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124122>
13. Imani D., Bahadori T., Ghourchian S., et al. Novel mouse monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* pertactin antigen with versatile applications. *J. Microbiol. Methods*. 2023;211:106786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106786>
14. Silva R.P., DiVenere A.M., Amengor D., Maynard J.A. Antibodies binding diverse pertactin epitopes protect mice from *Bordetella pertussis* infection. *J. Biol. Chem.* 2022;298(3):101715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101715>
15. Scanlon K., Skerry C., Carbonetti N. Association of pertussis toxin with severe pertussis disease. *Toxins (Basel)*. 2019;11(7):373. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11070373>
16. Loch C., Antoine R. The history of pertussis toxin. *Toxins (Basel)*. 2021;13(9):623. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13090623>
17. Loch C. Pasteurian contributions to the study of *Bordetella pertussis* toxins. *Toxins (Basel)*. 2023;15(3):176. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins15030176>
18. Koj S., Ługowski C., Niedziela T. *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates — new components of pertussis vaccine. *Postępy. Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2015;69:1013–30. (in Polish)

Информация об авторах

Зайцев Евгений Михайлович[✉] — д-р мед. наук, зав. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, lab.immunomod@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>

Брицина Марина Васильевна — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, britsinamarina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>

Озерецковская Мария Николаевна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, manja33@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>

Зайцев Антон Евгеньевич — канд. мед. наук, н. с. лаб. терапевтических вакцин НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, anton.zajtseff2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8434-231X>

Участие авторов: Зайцев Е.М. — формулирование идеи, исследовательских целей и задач; контроль и руководство за планированием и выполнением исследовательской работы; разработка методологии и проведение исследования; создание рукописи и её редактирование; Брицина М.В. — проведение исследования, формальный анализ, создание рукописи и её редактирование; Озерецковская М.Н., Зайцев А.Е. — проведение исследования; создание рукописи и её 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 21.01.2025;
принята к публикации 08.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Evgeny M. Zaitsev[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, lab.immunomod@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>

Marina V. Britsina — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, britsinamarina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>

Maria N. Ozeretskovskaya — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, manja33@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>

Anton E. Zaitsev — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of therapeutic vaccines, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, anton.zajtseff2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8434-231X>

Authors' contribution: Zaitsev E.M. — formulation of ideas, research goals and objectives; control and guidance over the planning and execution of research; development of methodology and research; creation of the manuscript and its editing; Britsina M.V. — research, formal analysis, creation of the manuscript and its editing; Ozeretskovskaya M.N., Zaitsev A.E. — conducting research; creation of the manuscript and its 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 21.01.2025;
accepted for publication 08.04.2025;
published 28.04.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>



Динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка, заражённых SARS-CoV-2 *ex vivo*

Абрамова С.А.^{1✉}, Ляпун И.Н.¹, Дробот Е.И.¹, Крылова Н.В.^{1,2}, Иунихина О.В.^{1,2}, Лубова В.А.¹, Мерлов Е.К.¹, Белов Ю.А.^{1,2}, Сомова Л.М.¹, Щелканов М.Ю.^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия;

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. Сохраняющаяся эпидемическая актуальность SARS-CoV-2 даже после завершения в 2023 г. связанной с ним пандемии COVID-19 определяет необходимость дальнейшего изучения взаимодействия этого вируса с клетками первой линии защиты — нейтрофилами.

Цель работы — определить ферментативную активность лейкоцитов периферической крови сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) в динамике SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo*, характеризующую микробицидный потенциал клеток врождённого иммунитета.

Материалы и методы. В работе использовался штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 в заражающих дозах 3 lg (ТЦД₅₀/мл) и 2 lg (ТЦД₅₀/мл) (ТЦД₅₀ — 50% тканевая цитопатическая доза для линии клеток Vero E6); время контакта заражающей вирусосодержащей жидкости с клеточной культурой — 1 ч. Количество жизнеспособных клеток в культуре адгезивных лейкоцитов подсчитывали с помощью инвертированного микроскопа, оснащённого цифровой камерой, и программы MCView. Удельную (в расчёте на 1 жизнеспособную клетку) активности аденозинтрифосфатазы (АТФазы), 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы, АМФазы), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), миелопероксидазы (МПО) и цитохромоксидазы (ЦХО) определяли спектрофотометрическим методом после инкубации со специфическими субстратами инфицированных и неинфицированных клеточных культур через 1, 16, 24, 48 ч после инокуляции вируса (п.и.в.).

Результаты. Через 1 ч п.и.в. по сравнению с неинфицированными лейкоцитами была снижена удельная активность АТФазы, МПО, повышена активность АМФазы, ЛДГ, СДГ; через 16 ч п.и.в. снижена активность МПО, повышена активность АМФазы, ЛДГ, СДГ, на исходном уровне, т. е. примерно на уровне неинфицированного контроля находится активность АТФазы, ЦХО; через 24 ч п.и.в. снижена активность АМФазы, повышена активность АТФазы, на исходном уровне — активность ЛДГ, СДГ, МПО, ЦХО; через 48 ч п.и.в. повышена активность АТФазы, ЛДГ, СДГ, МПО, ЦХО, на исходном уровне — активность АМФазы. Изменения ферментативной активности зависят от величины заражающей дозы и коррелируют с накоплением вируса в культуральной среде.

Заключение. Выявленная динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов, инфицированных SARS-CoV-2 *ex vivo*, свидетельствует о снижении микробицидного потенциала клеток врождённого иммунитета в процессе этой инфекции.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, лейкоциты, нейтрофилы, аденозинтрифосфатаза, 5'-нуклеотидаза, лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, миелопероксидаза, цитохромоксидаза, микробицидный потенциал

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 Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.05.2024).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 141-00017-24-01) «Молекулярно-генетические и фенотипические свойства возбудителей респираторных инфекций. Поиск эффективных соединений из наземной и морской биоты Дальнего Востока для разработки средств профилактики и лечения».

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

Для цитирования: Абрамова С.А., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Лубова В.А., Мерлов Е.К., Белов Ю.А., Сомова Л.М., Щелканов М.Ю. Динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка, заражённых SARS-CoV-2 *ex vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2025;102(2):168–178.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>

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

Dynamics of enzymatic activity in primary culture of Syrian hamster adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2

Svetlana A. Abramova^{1✉}, Irina N. Lyapun¹, Elena I. Drobot¹, Natalia V. Krylova^{1,2},
Olga V. Iunikhina^{1,2}, Valeria A. Lubova¹, Evgeniy K. Merlov¹, Iurii A. Belov^{1,2},
Larisa M. Somova¹, Mikhail Yu. Shchelkanov^{1,2}

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract

Introduction. The continued epidemic relevance of SARS-CoV-2, even after the end of the associated COVID-19 pandemic in 2023, necessitates further study of the interaction of this virus with the first line of cellular defense, neutrophils.

The aim of the study was to determine the enzymatic activity of peripheral blood leukocytes of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) in the dynamics of *ex vivo* SARS-CoV-2 infection, which characterizes the microbicidal potential of innate immunity cells.

Materials and methods. The SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 strain was used at infectious doses of 3 lg (TCID₅₀/mL) and 2 lg (TCID₅₀/mL) (TCID₅₀ is the 50% tissue cytopathic dose for the Vero E6 cell line); the contact time of the infecting virus-containing liquid with the cell culture was 1 h. The number of viable cells in the adherent leukocyte culture was counted using an inverted microscope equipped with a digital camera and MCVIEW program. The specific (per 1 viable cell) activities of adenosine triphosphatase (ATPase), 5'-nucleotidase (adenosine monophosphatase, AMPase), lactate dehydrogenase (LDH), succinate dehydrogenase (SDH), myeloperoxidase (MPO) and cytochrome oxidase (CCO) were determined spectrophotometrically after incubation with specific substrates of infected and uninfected cell cultures 1, 16, 24, 48 h after virus inoculation.

Results. The enzymatic activity of leukocytes 1 h after virus inoculation, compared to uninfected leukocytes, was as follows: specific activity of ATPase, MPO was decreased, activity of AMPase, LDH, SDH was increased; 16 h after virus inoculation, activity of MPO was decreased, activity of AMPase, LDH, SDH was increased, activity of ATPase and CCO was at the initial level, i.e. approximately at the level of the uninfected control; 24 h after virus inoculation, AMPase activity was decreased, ATPase activity was increased, LDH, SDH, MPO, CCO activity was at the initial level; 48 h after virus inoculation, ATPase, LDH, SDH, MPO, CCO activity was increased, AMPase activity was at the initial level. Changes in enzymatic activity depend on the infecting dose and correlate with virus accumulation in the culture medium.

Conclusion. The revealed dynamics of enzymatic activity in the primary culture of adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2 indicates a decrease in the microbicidal potential of cells of innate immunity in the course of this infection.

Keywords: SARS-CoV-2, leukocytes, neutrophils, ATPase, 5'-nucleotidase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, myeloperoxidase, cytochrome oxidase, microbicidal potential

Ethics 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 Ethics Committee of the Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 2, May 16, 2024).

Funding source. The study was performed within the framework of the state assignment of the Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (№ 141-00017-24-01) "Molecular-genetic and phenotypic properties of respiratory pathogens. Search for effective compounds from terrestrial and marine biota of the Far East for the development of prophylactic and treatment agents".

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

For citation: Abramova S.A., Lyapun I.N., Drobot E.I., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Lubova V.A., Merlov E.K., Belov I.A., Somova L.M., Shchelkanov M.Yu. Dynamics of enzymatic activity in primary culture of Syrian hamster adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):168–178.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>

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

Введение

Коронавирус тяжёлого острого респираторно-го синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 — severe acute respiratory coronavirus 2) (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) является этиологическим агентом коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19), пандемия которого (2020–2023 гг.) стала самой продолжительной и одной из наиболее смертоносных среди острых респираторных заболеваний в новейшей истории человечества [1]. После окончания пандемического периода SARS-CoV-2 не исчез из человеческой популяции, а превратился в одну из составляющих в структуре сезонного подъёма заболеваемости острыми респираторными заболеваниями [2]. По этой причине изучение патогенеза SARS-CoV-2-инфекции не теряет своей актуальности, ряд аспектов этого процесса изучен недостаточно полно. В связи с этим особый интерес вызывает процесс взаимодействия вируса с клетками периферической крови, в частности, с клетками врождённого иммунитета — нейтрофилами и моноцитами.

В доступной литературе изложены теоретические предположения о возможной способности вируса SARS-CoV-2 инфицировать нейтрофилы. Так, N. Rong и соавт. сообщили о рецепторе CD147, альтернативном рецептору ACE2, который обуславливает тропизм вируса, экспрессируется в нейтрофилах здоровых доноров и активируется у пациентов с COVID-19 [3]. Другим неканоническим рецептором является лектиновый рецептор С-типа, который опосредует образование нейтрофильных внеклеточных ловушек при COVID-19 [4]. Исходя из этого можно сделать предположение о том, что вирус способен непосредственно влиять на лейкоциты крови.

Описанные нами ранее морфологические изменения лейкоцитов периферической крови также свидетельствуют об их значительном вовлечении в процесс SARS-CoV-2-инфекции [5–8]. Однако в научной литературе отсутствует подробная информация о характере и динамике ферментативной активности лейкоцитов при инфицировании данным вирусом. Имеются отдельные сообщения об изменениях активности миелопероксидазы (МПО) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови пациентов с диагнозом COVID-19, причём выраженность этих изменений коррелирует с тяжестью основного заболевания [9–11]. По этой причине необходимо изучить не только морфологические, но и морфофункциональные изменения в комплексе с целью суждения о метаболических процессах клеток врождённого иммунитета под влиянием SARS-CoV-2.

Целью данной работы является определение ферментативной активности лейкоцитов периферической крови сирийских хомячков в динамике

SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo*, характеризующей микробицидный потенциал клеток врождённого иммунитета.

Материалы и методы

Первичную адгезивную культуру лейкоцитов сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*) получали из крови 15 особей в возрасте 4 мес и массой около 100 г. Все процедуры с животными выполняли строго в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 18.03.1986. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.05.2024).

Кровь собирали из сердца в стеклянные пробирки с добавлением в каждую гепарина из расчёта 5 ЕД/мл. Пробирки помещали в термостат под углом 45° при 37°C на 1 ч, после чего осторожно удаляли верхний слой плазмы, а лейкоцитарную плёнку отбирали, доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл питательной средой 199 («БиолоТ») и разносили по 100 мкл в лунки плоскодонного 96-луночного планшета («TFS»), который помещали в термостат (5% CO₂, 37°C) на 40 мин; затем среду с неадгезированными клетками удаляли и лунки трижды промывали 150 мкл среды 199.

Количество живых адгезированных клеток в лунке определяли с помощью инвертированного микроскопа «МИБ-Р» («ЛОМО»), оснащённого цифровой камерой MC-8.3 С («ЛОМО»). С помощью программы MCView («ЛОМО-Microsystems») площадь поля зрения, не включающего край лунки, выставляли равной 0,26 мм², подсчитывали в ней число (*n*) живых (прикреплённых с целостной внешней мембраной) клеток; пересекающие внешнюю границу клетки учитывали на левой/верхней гранях квадрата поля зрения и не учитывали на правой/нижней гранях. Поскольку общая площадь лунки равна 35 мм², то общее количество клеток в лунке (*N*) оценивали по формуле:

$$N = n \times \frac{35,00 \text{ мм}^2}{0,26 \text{ мм}^2} \approx 134,62 \times n. \quad (1)$$

Итоговую оценку количества живых клеток в каждой лунке производили по 10 случайно выбранным полям зрения.

Инфицирование первичной культуры адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка *ex vivo* осуществляли путём внесения в лунки с монослоем клеток 100 мкл среды 199 с рабочим разведением супернатанта клеточной культуры Vero E6, инфицированной SARS-CoV-2 (в контрольные образцы — без вирусодержащего супернатанта) и последующей инкубацией 1 ч при 37°C, после чего прово-

дили трёхкратную промывку и заполнение лунок средой для культивирования, содержащей среду 199 с 15% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и 0,004% гентамицина К («БиолоТ»). Были использованы две инфицирующие дозы: 3 lg (ТЦД₅₀/мл) и 2 lg (ТЦД₅₀/мл), где ТЦД₅₀ — это 50% тканевая цитопатическая доза для линии клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*, ♀) (Vero E6).

Штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 был получен из Коллекции патогенных микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. Данный штамм относится к генотипу Delta (AY.121) (VGARus ID: prim000041; GenBank ID: OQ318430; GISAID ID: EPI_ISL_16643370) и был выделен из назофарингеального смыва больного COVID-19 в декабре 2021 г. на модели клеточной линии Vero E6 [2].

Индикацию РНК SARS-CoV-2 осуществляли с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» («Синтол»). РНК выделяли с использованием комплекса реагентов «М-Сорб-НК» («Синтол»). Все манипуляции осуществляли согласно протоколам производителя. Пороговый цикл (threshold cycle, C_T) ОТ-ПЦР-РВ рассматривали как полуколичественную характеристику содержания вирусных частиц в среде: чем выше их содержание, тем ниже C_T. Отсутствие вируса соответствовало C_T ≥ 36.

Активность аденозинтрифосфатазы (АТФазы) и аденозинмонофосфатазы (АМФазы) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунку планшета 50 мкл субстрата для АТФазы (8 мг/мл аденозин-5'-трифосфата в 10-кратно разведённом трис-НСl-буфере, рН 7,8, содержащем 87 мг NaCl, 28,7 мг KCl, 5,2 мг MgCl₂ × 6 H₂O) и для АМФазы (4 мг/мл аденозин-5'-монофосфата в таком же буферном растворе, содержащем 87 мг NaCl и 70 мг MgCl₂). Образцы оставляли при 37°C на 30 и 60 мин соответственно. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1 : 1. Через 20 мин поглощение растворов измеряли¹ при длине волны 620 нм [12].

Активность ЛДГ и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунку планшета 100 мкл раствора йодонитротетразолия («ICN») — для ЛДГ и бро-

мида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума («ICN») — для СДГ 2 мг/мл в фосфатном буфере рН 7,2 с 0,4% MnCl₂ и инкубировали 30 мин при 37°C; затем среду удаляли и монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса рН 7,2. Внутриклеточные гранулы диформаза растворяли в 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм (для ЛДГ) и 540 нм (для СДГ) [12].

Активность МПО и цитохромоксидазы (ЦХО) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунки планшета 100 мкл раствора ортофенилендиамина («Merck») 0,4 мг/мл — для МПО и 3,3'-диаминобензида («Merck») 2 мг/мл — для ЦХО в фосфатно-цитратном буфере рН 5,0 с 0,033% H₂O₂ и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10% раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм [12].

Вирусную нагрузку в динамике SARS-CoV-2-инфекции устанавливали полуколичественным методом на основе изменения порогового цикла в ОТ-ПЦР-РВ (C_T(0)), через 1 ч (C_T(1)) — в вируссодержащей жидкости после контакта с клетками; 16 ч (C_T(16)), 24 ч (C_T(24)) и 48 ч (C_T(48)) — в ростовой среде инфицированных клеток.

Ферментативную активность клеток под действием SARS-CoV-2-инфекции определяли через 1, 16, 24, 48 ч после инокуляции вируса (п.и.в.) путём сравнения отношений удельных (в расчёте на 1 клетку) ферментативных активностей инфицированных и неинфицированных клеток: для каждого момента времени *t* вычисляли коэффициент изменения удельной ферментативной активности $\gamma(t)$ по формуле:

$$\gamma(t) = \frac{\tilde{D}(t)}{\tilde{z}(t)} \times \frac{z(t)}{D(t)}, \quad (2)$$

где учтены оптическая плотность и количество живых клеток для неинфицированного (*D(t)* и *z(t)*) и инфицированного ($\tilde{D}(t)$ и $\tilde{z}(t)$) образцов соответственно [13, 14]. Разумеется, имеет место априорное равенство:

$$\gamma(t) = 1. \quad (3)$$

Статистическая обработка результатов основывалась на том, что в каждый момент времени *t* для каждого из 6 ферментов измерения осуществляли в 3 лунках с неинфицированными клетками и в 3 лунках с инфицированными клетками. Для этого в начале производили удаление поддерживающей среды, чтобы после промывки внести среды с соответствующими субстратами. Пронумеруем ферменты в произвольном порядке, используя индекс

¹ Здесь и далее фотометрические измерения осуществляли с использованием спектрофотометра «Multiscan RC» («LabSystems»). Бланкирование проводили по раствору равного количества среды без соответствующих субстратов и клеток.

$f = 1, 2, \dots, 6$. Тогда в каждый момент времени t имеется $6 \times 3 = 18$ образцов вирусосодержащей жидкости: $C_{Tf}(t), j = 1, 2, 3$. При этом $C_{Tf}(1)$ представляли собой вирусную нагрузку в образцах в результате накопления вируса в среде *de novo*: после того как исходная вирусосодержащая жидкость $C_{Tf}(0)$ в течение 1 ч находилась в контакте с клетками; $C_{Tf}(16)$, $C_{Tf}(24)$ и $C_{Tf}(48)$. Таким образом, для $t = 1, 16, 24, 48$ ч выборочное среднее $\langle C_T(t) \rangle$ и стандартное отклонение выборочного среднего m_{CT} определяются по стандартным формулам в следующей модификации:

$$\langle C_T(t) \rangle = \frac{1}{18} \times \sum_{f=1}^6 \sum_{j=1}^3 C_{Tf}(t); \quad (4)$$

$$m_{CT} = \frac{1}{3\sqrt{34}} \times \left(\sum_{f=1}^6 \sum_{j=1}^3 (C_{Tf}(t) - \langle C_T(t) \rangle)^2 \right)^{1/2}. \quad (5)$$

Исходный образец был в единственном экземпляре, и его вирусную нагрузку характеризовало единственное значение $C_T(0)$.

После проведения химических реакций, которые катализируются изучаемыми ферментами, измеряли оптическую плотность в 3 лунках с неинфицированными клетками ($D_i(t)$, $i = 1, 2, 3$) и в 3 лунках с инфицированными ($\tilde{D}_j(t)$, $j = 1, 2, 3$) клетками. Перед этим в каждой лунке измеряли количество живых клеток: $z_i(t)$ ($i = 1, 2, 3$) и $\tilde{z}_j(t)$ ($j = 1, 2, 3$). Оценку каждого значения $z_i(t)$ и $\tilde{z}_j(t)$ осуществляли по 10 полям зрения в соответствии с (1)²: $z_{ik}(t)$, $k = 1, 2, \dots, 10$ и $\tilde{z}_{hk}(t)$, $h = 1, 2, \dots, 10$. При этом все измерения $D_i(t)$, $z_{ik}(t)$, $\tilde{D}_j(t)$, $\tilde{z}_{jh}(t)$ при любых значениях коэффициентов независимы и равноправны. Существует 30 значений дроби $\tilde{D}_j(t)/\tilde{z}_{jh}(t)$, 30 значений дроби $z_{ik}(t)/D_i(t)$ и 900 вариантов их произведений вида (2), т. е. выборка состоит из 900 значений $\gamma(t)$. Поэтому выборочное среднее $\langle \gamma(t) \rangle$ и стандартное отклонение выборочного среднего $m_{\gamma(t)}$ рассчитывали по стандартным формулам, модифицированным для данного случая:

$$\langle \gamma(t) \rangle = \frac{1}{900} \times \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^{10} \sum_{j=1}^3 \sum_{h=1}^{10} \frac{\tilde{D}_j(t)}{\tilde{z}_{jh}(t)} \frac{z_{ik}(t)}{D_i(t)}; \quad (6)$$

² Подсчёт жизнеспособных клеток в суспензионных культурах проще всего проводить в камере Горяева, извлекая небольшой объём ростовой среды с клеточной взвесью. Этот метод более удобен для однократного измерения (который не даёт достаточной статистической точности), но затруднителен в случае нескольких повторов; кроме того, достоверность результатов МТТ-тестов при работе с суспензионными клеточными культурами дополнительно снижается артефактным захватом клеток при промывке, что приходится компенсировать применением дозаторных наконечников специальной конструкции (S-tips) [15].

$$m_{\gamma(t)} = \frac{1}{30\sqrt{899}} \times \left(\sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^{10} \sum_{j=1}^3 \sum_{h=1}^{10} \left(\frac{\tilde{D}_j(t)}{\tilde{z}_{jh}(t)} \times \frac{z_{ik}(t)}{D_i(t)} - \langle \gamma(t) \rangle \right)^2 \right)^{1/2}; \quad (7)$$

Достоверность различий между выборками из 900 значений для значений времени — $\gamma(t_1)$ и $\gamma(t_2)$, а также между выборками из 18 значений для значений времени $C_T(t_1)$ и $C_T(t_2)$, где $t_1 = 1, 16, 24, 48$ ч, $t_2 = 1, 16, 24, 48$ ч, $t_1 \neq t_2$, оценивали с помощью критерия Манна–Уитни–Вилкоксона. Этот непараметрический критерий не требует априорных предположений о функции распределения случайных величин, реализацией которых являются значения $\gamma(t)$ и $C_T(t)$. Достоверной считалась оценка при вероятности реализации альтернативной гипотезы $p \leq 0,05$.

Результаты

Содержание SARS-CoV-2 в ростовой среде культуры адгезивных лейкоцитов показано на **рис. 1** (здесь и далее следует иметь в виду, что большему значению C_T соответствует меньшее содержание вируса в исследуемом образце). В течение 1-го часа п.и.в., когда имел место контакт вирусосодержащей жидкости с клетками, происходило их инфицирование. После удаления вирусосодержащей жидкости новые частицы в среде накапливались в результате репликации вируса в заражённых клетках. Учитывая тот факт, что это разные этапы инфекционного процесса, на динамических кривых рис. 1 сделан разрыв.

Через 1 ч п.и.в. (к окончанию процесса заражения) активность АТФазы адгезивных лейкоцитов под действием SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo* дозозависимым образом снизилась относительно неинфицированного контроля ($\gamma(1) < 1$), но затем начала также дозозависимо повышаться: $\gamma(16) \sim 1$; $\gamma(24) \approx 1,2$; $\gamma(48) \approx 1,6$ (**рис. 2, а**). Возрастание АТФазной активности в период 16–48 ч было почти линейным при незначительном, но воспроизводимом превышении активности для дозы $3 \lg(\text{ТЦД}_{50})$ по сравнению с $2 \lg(\text{ТЦД}_{50})$.

Активность АМФазы в процессе инфекции (**рис. 2, б**) изменялась иначе, нежели активность АТФазы. В начальный период инфекции уровень 5'-нуклеотидазы быстро повысился по сравнению с неинфицированным контролем и держался на этом уровне по меньшей мере 16 ч п.и.в., затем снижался к 24 ч ($\gamma(24) \approx 0,8$ для обеих заражающих доз) и медленно возрастал в течение последующих 24 ч ($\gamma(48) \sim 1$).

Изменения активности ЛДГ (**рис. 2, в**) и СДГ (**рис. 2, г**) в процессе инфекции были аналогичны:

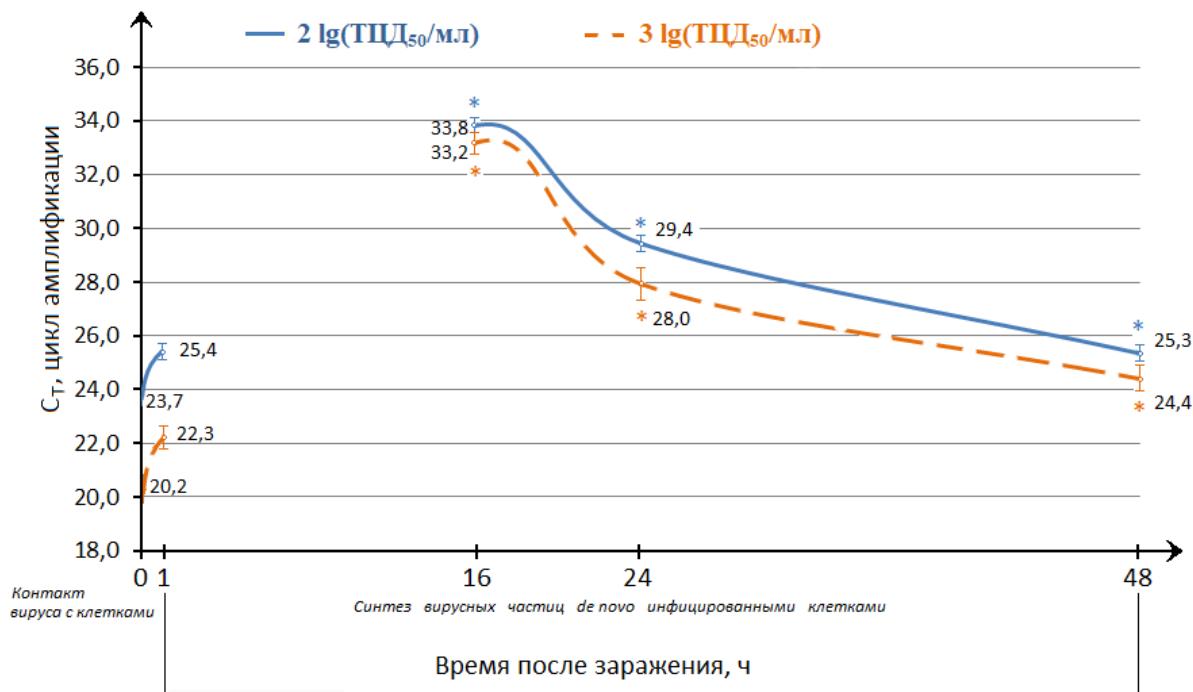


Рис. 1. Динамика вирусной нагрузки: меньшим значениям C_T соответствуют более высокие значения концентрации вирионов, и наоборот.

В течение 1-го часа после инокуляции вируса концентрация вирионов падает вследствие их проникновения в клетки-мишени. После этого происходит смена среды и начинается накопление *de novo* дочерних вирионов, продуцируемых инфицированными клетками.
 * $p \leq 0,05$ по сравнению со значением C_T в предыдущий момент времени.

сначала небольшой резкий рост ($\gamma(1) \approx \gamma(16) \approx 1,2$), затем возвращение к значению активности неинфицированного контроля ($\gamma(24) \sim 1$) и возрастание в течение последующих 24 ч ($\gamma(48) \approx 1,8$). Снижение активности дегидрогеназ через 24 ч после инфицирования воспроизводится во всех случаях и, скорее всего, имеет дозозависимый характер (наиболее выраженный для СДГ).

Активность МПО в инфицированных клетках дозозависимым образом быстро снижалась по сравнению с неинфицированным контролем уже в течение 1 ч п.и.в. (рис. 2, *д*) и восстанавливалась к прежнему уровню через 24 ч ($\gamma(24) \sim 1$), после чего возрастала ($\gamma(48) \approx 1,4$).

Активность ЦХО сначала дозозависимо снижалась (рис. 2, *е*), но затем возвращалась к уровню неинфицированного контроля уже через 16 ч п.и.в. ($\gamma(16) \approx \gamma(24) \approx 1,0$), после чего возрастала до $\gamma(48) \approx 1,2$ для дозы $2 \lg(\text{ТЦД}_{50})$ и до $\gamma(48) \approx 1,4$ для дозы $3 \lg(\text{ТЦД}_{50})$.

Обсуждение

Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) являются удобной экспериментальной моделью для воспроизведения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [1, 16, 17]. В данной работе мы использовали инфицирование *ex vivo* культуры адгезивных лейкоцитов, которая содержит основную фракцию нейтрофилов, претерпевающих комплекс морфофунк-

циональных изменений при контакте с инфекционными агентами [18]. Нейтрофилы — важное звено врождённого иммунитета, являются достаточно короткоживущими лейкоцитами, и уже через 48 ч их адгезивная популяция быстро истощается (это, в частности, определяет выбранную нами продолжительность эксперимента).

Известно, что АМФаза (5'-нуклеотидаза) и АТФаза активно вовлекаются в процесс пространственного преобразования плазматической мембраны нейтрофилов при хемотаксисе [18, 19]. В частности, 5'-нуклеотидаза является регулятором уровня циклического АМФ, который обеспечивает передачу сигналов от плазмалеммы внутрь клетки и регулирует образование внеклеточного аденозина, который через специфические рецепторы опосредует цитозащиту и разнообразные физиологические эффекты (подавление воспаления, вазодилатацию, ингибирование тромбоза, антиадренергию и др.) [20]. При повреждении клетки повышается содержание АМФ и понижается — АТФ [21, 22]. Соответственно, увеличение активности АМФазы и снижение активности АТФазы было зафиксировано в течение первых 16 ч п.и.в. Ранние этапы повреждения коронавирусами клеток-мишеней связаны с рецептор-опосредованным слиянием вирус-клеточных мембран и формированием в шероховатом эндоплазматическом ретикулеуме инфицированной клетки специальных цистерн, в которых

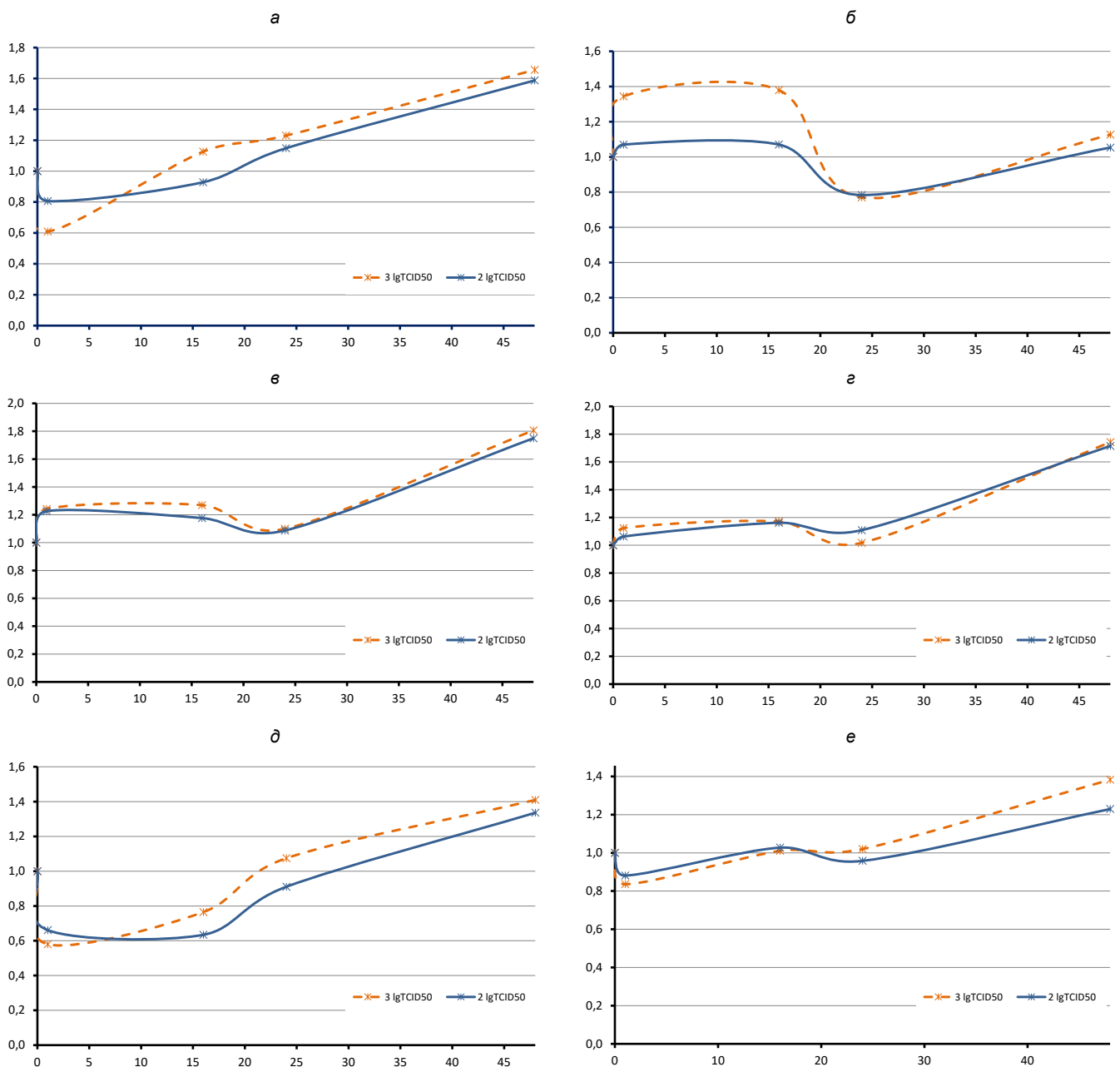


Рис. 2. Изменения активности ферментов в результате инфекции SARS-CoV-2: АТФазы (а); АМФазы или 5'-нуклеотидазы (б); ЛДГ (в); СДГ (г); МПО (д); ЦХО (е).

По осям ординат — γ ; по осям абсцисс — время после заражения, ч. * $p \leq 0,05$ по сравнению со значением γ в предыдущий момент времени.

происходит сборка вирионов [23, 24]. Монотонное возрастание активности АТФазы, начиная примерно с 16 ч п.и.в., связано с активным синтезом вирусных белков (как структурных, так и регуляторных) и вирусспецифических РНК. Повторное возрастание активности АМФазы позже 24 ч п.и.в. (рис. 2, а, б), по-видимому, отражает процесс вторичного инфицирования лейкоцитов (в том числе в результате синцитиеобразования).

ЛДГ представляет собой цинксодержащий внутриклеточный фермент, который катализирует

окисление молочной кислоты в пируват, принимает участие в обмене глюкозы, содержится практически во всех клетках организма и высвобождается при их повреждении [25]. Поэтому уровень сывороточной ЛДГ надёжно маркирует уровень неблагоприятных последствий воспалительных реакций и других патологических процессов. В частности, выявлена информативность уровня сывороточной ЛДГ для оценки клинической тяжести и мониторинга ответа на лечение при пневмонии у пациентов с COVID-19 [26]. СДГ относится к кофермент-не-

зависимым флавипротеинам и входит в мембрано-связанную дыхательную цепь мембран. Флавиновая группа этого фермента содержит 4 атома железа и ковалентно связана с белком, а ферментативная активность СДГ зависит от SH-групп [25]. СДГ млекопитающих не только участвует в образовании энергии в митохондриях, но также играет роль в чувствительности клетки к кислороду [27]. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток сначала возрастает вследствие стимуляции вирусом репликационных процессов, а затем снижается в результате вирусиндуцированной цитодеструкции: на модели вируса иммунодефицита человека 1-го типа (Ortervirales: Retroviridae, *Lentivirus*) и иммортализованных клеточных линий различного происхождения показано, что величина и скорость такого дегидрогеназного сдвига пропорциональны заражающей дозе и уровню патогенности конкретного штамма (при одинаковой заражающей дозе) [13, 14]. В условиях описанного в данной статье эксперимента дегидрогеназная активность SARS-CoV-2-инфицированной первичной культуры адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка (рис. 2, в, з) имеет два максимума: на 1-е сутки, который связан со входом вируса в клетку, и позже 1-х суток — в связи с продукцией вируса *de novo* (рис. 1, 2). Ещё одно объяснение (связанное с предыдущим): первый пик дегидрогеназной активности связан с жизнедеятельностью нейтрофилов, а второй — с более долгоживущими моноцитами (но пик максимума не был достигнут в связи с тем, что целью эксперимента было изучение в первую очередь биохимии инфицированных нейтрофилов).

МПО — гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосому [28]. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного анион-радикала в гипохлорную кислоту, осуществляя защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [29]. После активации фагоцитов происходит дегрануляция, и МПО секретируется внутрь фагосомы либо во внеклеточное пространство. МПО является важной составной частью антимикробной активности фагоцитов, обеспечивающей врождённый неспецифический иммунитет. В ситуации *in vivo* МПО высвобождается во внеклеточную жидкость (в частности, в кровь), в том случае если по какой-либо причине нейтрофил не может фагоцитировать патоген, при клеточном лизисе или когда нейтрофил подвергается воздействию различных растворимых факторов [28].

При использовании автоматизированных цитохимических счётчиков клеток крови у пациентов с диагнозом COVID-19 отмечалось снижение активности МПО [9]. Вместе с тем при образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек, формирующих одну из линий защиты от патогенов (включая

вирусы, в том числе — SARS-CoV-2), выявляется повышение активности МПО во внеклеточном пространстве [30–32]. Снижение содержания МПО в культуре адгезивных лейкоцитов в течение 1 сут п.и.в. (рис. 1, е) может объясняться тем, что под действием SARS-CoV-2-инфекции нейтрофилы экскретируют МПО во внеклеточное пространство и формируют подобные нейтрофильным внеклеточным ловушкам структуры *ex vivo*.

ЦХО локализуется главным образом на внутренней мембране митохондрий, где захватывает протоны из внутримитохондриального матрикса и, перенося электроны с цитохрома С на кислород, восстанавливает O_2 до H_2O . Этот фермент играет важную роль в функционировании аэробного звена дыхательной цепи и производстве энергии в клетках эукариот [25]. Поэтому снижение активности ЦХО коррелирует со снижением активности АТФазы в первые часы п.и.в. (см. рис. 2, а и е). Кроме того, в лейкоцитах активность ЦХО служит достоверным показателем уровня окислительного метаболизма, и при гибели клеток её активность повышается [25] — именно этот эффект наблюдается в культуре адгезивных лейкоцитов к концу 1-х суток п.и.в. (рис. 2, е).

Обнаруженные изменения ферментативного спектра SARS-CoV-2-инфицированных лейкоцитов имеют дозозависимый характер (рис. 2): модуль таких изменений пропорционален заражающей дозе вируса. При анализе динамики ферментативной активности необходимо учитывать, что к концу 1-х суток п.и.в. клеточный состав культуры адгезивных лейкоцитов уменьшается за счёт короткоживущих нейтрофилов, но при этом в культуре остаются более долгоживущие клетки.

Разумеется, нельзя исключить, что инфицированные вирусом SARS-CoV-2 клетки Vero E6 продуцируют растворимые экзогенные факторы, способные повлиять на физиологию клеток при заражении, поскольку использовался вирусосодержащий супернатант клеточной культуры Vero E6. Однако известно, что клетки линии Vero и Vero E6 не продуцируют интерферон I типа за счёт потери кластера генов интерферона I типа [33, 34] и являются дефектными по продукции интерферонов- α -1/13, α -2, α -4, α -6, α -8, α -14, α -17, α -21, β -1 и ω -1 [33]. Что касается остальных вирусосодержащих растворимых факторов — они могут стать предметом дальнейших исследований.

Вывод

Обнаруженные изменения ферментативной активности в нейтрофилах, инфицированных SARS-CoV-2 *ex vivo*, свидетельствуют о снижении микробицидного потенциала этих клеток врождённого иммунитета, что является одной из причин дисфункции иммунной системы при COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Щелканов М.Ю. Этиология COVID-19. В кн.: *COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей*. М.;2023:11–53. Shchelkanov M.Yu. Etiology of COVID-19. In: *COVID-19: from Etiology to Vaccination. A Guide for Doctors*. Moscow;2023:11–53. EDN: <https://elibrary.ru/itytdm>
- Попова А.Ю., Щелканов М.Ю., Крылова Н.В. и др. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):19–35. Popova A.Yu., Shchelkanov M.Y., Krylova N.V., et al. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky krai during the COVID-19 pandemic. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):19-35. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497> EDN: <https://elibrary.ru/pujffa>
- Rong N., Wei X., Liu J. The role of neutrophil in COVID-19: positive or negative. *J. Innate Immun*. 2024;16(1):80–95. DOI: <https://doi.org/10.1159/000535541>
- Zhu Y., Chen X., Liu X. NETosis and neutrophil extracellular traps in COVID-19: Immunothrombosis and beyond. *Front. Immunol*. 2022;13:838011. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838011>
- Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И. и др. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021;10(1):11–20. Somova L.M., Kotsyurbiy E.A., Drobot E.I., et al. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical and Experimental Morphology*. 2021;10(1):11–20. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.1.11-20> EDN: <https://elibrary.ru/uprrqm>
- Сомова Л.М., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В. и др. Морфология лейкоцитов периферической крови у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2023;12(3):41–9. Somova L.M., Drobot E.I., Pustovalov E.V., et al. Morphology of peripheral blood leucocytes in patients with new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical and Experimental Morphology*. 2023;12(3):41–9. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2023.12.3.41-49> EDN: <https://elibrary.ru/vcxery>
- Сомова Л.М., Абрамова С.А., Дробот Е.И. и др. Нейтрофильные синцитии в периферической крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19). *Клиническая экспериментальная морфология*. 2024;13(3):26–33. Somova L.M., Abramova S.A., Drobot E.I., et al. Neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients with coronavirus infection (COVID-19). *Clinical Experimental Morphology*. 2024;13(3):26–33. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2024.13.3.26-33> EDN: <https://elibrary.ru/soelfa>
- Абрамова С.А., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В. и др. Ультраструктурная патология клеток врожденного иммунитета при COVID-19. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2023;(45):109–11. Abramova S.A., Drobot E.I., Pustovalov E.V., et al. Ultrastructure pathology of innate immunity cells during COVID-19. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2023;(45):109–11. EDN: <https://elibrary.ru/jtwvjg>
- Han Y., Zhang H., Mu S., et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(12):11245–58. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.103372>
- Poggiali E., Zaino D., Immovilli P., et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in COVID-19 patients. *Clin. Chim. Acta*. 2020;509:135–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.012>
- Zini G., d'Onofrio G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Focus on peripheral blood cell morphology. *Br. J. Haematol*. 2023;200(4):404–19. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.18489>
- Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Кондрашова Н.М., Запорожец Т.С. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма: Методические рекомендации. Владивосток;2005. Somova L.M., Plekhova N.G., Kondrashova N.M., Zaporozhets T.S. Determination of the functional activity of peripheral blood leukocytes as an indicator of nonspecific body protection: Methodological recommendations. Vladivostok;2005.
- Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Бурунова В.В. и др. Дегидрогеназная активность ВИЧ-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста. *Иммунология*. 1999;20(1):37–41. Shchelkanov M.Yu., Sakhuria I.B., Burunova V.V., et al. HIV-infected cell dehydrogenase activity in the evaluation of anti-HIV compound efficiency. *Immunologiya*. 1999;20(1):37–41. EDN: <https://elibrary.ru/lqohkg>
- Щелканов М.Ю., Ерёмин В.Ф., Сахурия И.Б. и др. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток и биологические свойства различных вариантов ВИЧ-1. *Биохимия*. 1999;64(4):513–9. Shchelkanov M.Yu., Eremin V.F., Sakhuriya I.B., et al. Dehydrogenase activity of infected cells and biological properties of HIV-1 variants. *Biochemistry (Moscow)*. 1999;64(4):431–6. EDN: <https://elibrary.ru/lfiulj>
- Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Полякова Е.Б. и др. Повышение качества МТТ-метода с помощью микродозаторных наконечников специальной конструкции. *Иммунология*. 1998;19(4):57–9. Shchelkanov M.Yu., Sakhuriya I.B., Polyakova E.B., et al. Improvement of the MTT-based assay by modification of pipette tips. *Immunology (Moscow)*. 1998;19(4):57–9. EDN: <https://elibrary.ru/mpawbj>
- Грачева А.В., Дроков А.О., Смирнова Д.И. и др. Вирулентность и тканевая специфичность разных эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 для золотистых сирийских хомячков. *Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):470–82. Gracheva A.V., Drovkov A.O., Smirnova D.I., et al. Virulence and tissue tropism of different epidemiologically significant SARS-CoV-2 variants for golden Syrian hamsters. *Journal of Epidemiology, Microbiology and Immunobiology*. 2024;101(4):470–82. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-528> EDN: <https://elibrary.ru/jukmca>
- Фоменко Е.П., Гапека А.В., Милованкин П.Г. и др. Эффективные животные модели для изучения SARS-CoV-2-инфекции. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2024;(47):36–8. Fomenko E.P., Gapeka A.V., Milovankin P.G., et al. Effective animal models for the study of SARS-CoV-2 infection. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2024;47(47):36–8. DOI: <https://doi.org/10.62963/2073-2899-2024-47-36-38> EDN: <https://elibrary.ru/rfideaj>
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Слонова Р.А. и др. Метаболическая активность макрофагов, зараженных Hantaviruses — возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Биохимия*. 2005;70(9):1198–208. Plekhova N.G., Somova L.M., Slonova R.A., et al. Metabolic activity of macrophages infected with hantaviruses, an agent of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(9):990–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0214-0> EDN: <https://elibrary.ru/ljdewp>
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций. *Тихоокеанский медицин-*

- ский журнал. 2010;(3):5–9. Plekhova N.G., Somova L.M. The role of monocytes/macrophages in pathogenesis of viral infections. *Pacific Medical Journal*. 2010;(3):5–9. EDN: <https://elibrary.ru/oiheqp>
20. Zukowska P., Kutryb-Zajac B., Toczek M., et al. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol. Rep.* 2015;67(4):675–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.002> EDN: <https://elibrary.ru/xouav1>
21. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программной гибели клетки: различные механизмы гибели (обзор). *Биохимия*. 2005;70(2):284–93. Bras M., Queenan B., Susin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(2):231–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0105-4> EDN: <https://elibrary.ru/mhrivj>
22. Осолок Л.Н., Порядин Г.В. Основные механизмы повреждения клеток. М.;2016. Oskolok L.N., Poryadin G.V. *The Main Mechanisms of Cell Damage*. Moscow;2016. EDN: <https://elibrary.ru/xglrxt>
23. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А. и др. COVID-19: этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(3):421–45. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., et al. COVID-19: Etiology, Clinical Picture, Treatment. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(3):421–45. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473> EDN: <https://elibrary.ru/imaadb>
24. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г. и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(2):221–46. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., et al. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(2):221–46. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412> EDN: <https://elibrary.ru/kziwrq>
25. Кольман Я., Рём К.Г. *Наглядная биохимия*. Пер. с нем. М.;2004. Koolman J., Röhm K.H. *Taschenatlas der Biochemie*. New York;1998. EDN: <https://elibrary.ru/qkmqbj>
26. Wu M.Y., Yao L., Wang Y.I., et al. Clinical evaluation of potential usefulness of serum lactate dehydrogenase (LDH) in 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *Respir. Res.* 2020;21(1):171. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01427-8> EDN: <https://elibrary.ru/ojobmo>
27. Bardella C., Pollard P.J., Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1807(11):1432–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.003> EDN: <https://elibrary.ru/phvbwX>
28. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77(5):598–625. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697> EDN: <https://elibrary.ru/mfbqgj>
29. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000;80(5):617–53. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>
30. Ashar H.K., Mueller N.C., Rudd J.M., et al. The role of extracellular histones in influenza virus pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 2018;188(1):135–48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.014> EDN: <https://elibrary.ru/yfdncp>
31. Bader S.M., Cooney J.P., Pellegrini M., Doerflinger M. Programmed cell death: the pathways to severe COVID-19? *Biochem. J.* 2022;479(5):609–28. DOI: <https://doi.org/10.1042/bcj20210602> EDN: <https://elibrary.ru/kcewfw>
32. Kapoor S., Mihalovičová L., Pisareva E., et al. Association of vascular netosis with COVID-19 severity in asymptomatic and symptomatic patients. *iScience*. 2024;27(5):109573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109573> EDN: <https://elibrary.ru/rvfnsE>
33. Osada N., Kohara A., Yamaji T., et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res.* 2014;21(6):673–83. DOI: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
34. Konishi K., Yamaji T., Sakuma C., et al. Whole-genome sequencing of Vero E6 (Vero C1008) and comparative analysis of four Vero cell sublines. *Front. Genet.* 2022;13:801382. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801382>

Информация об авторах

Абрамова Светлана Алексеевна[✉] — аспирант, м. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, svetochey99@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Ляпун Ирина Николаевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, irina-lyapun@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Дробот Елена Игоревна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, eidrobot@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Крылова Наталья Владимировна — д-р биол. наук, в. н. с., зав. лаб. респираторных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, krylovanatalya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Иунихина Ольга Викторовна — канд. мед. наук, зав. лаб. природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, olga_iun@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Information about the authors

Svetlana A. Abramova[✉] — junior researcher, Pathology laboratory, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, svetochey99@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, irina-lyapun@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Elena I. Drobot — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, eidrobot@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Natalia V. Krylova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of respiratory infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Assistant Professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rosпотребнадзор, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, krylovanatalya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Olga V. Iunikhina — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of natural focal infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Assistant Professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rosпотребнадзор, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, olga_iun@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Лубова Валерия Александровна — н. с. лаб. природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, valeri_priority@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4290-6164>

Мерлов Евгений Константинович — м. н. с. отд. экспериментальной биомедицины НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, zhenya.merlov.2000@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1515-3221>

Белов Юрий Александрович — м. н. с., зав. центром молекулярной диагностики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; ассистент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, bornley@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Сомова Лариса Михайловна — д-р мед. наук, профессор, г. н. с., зав. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, l_somova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Щелканов Михаил Юрьевич — д-р биол. наук, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; зав. каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Участие авторов: *Абрамова С.А.* — концепция и дизайн исследования, обработка и анализ материала, написание текста; *Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Лубова В.А., Мерлов Е.К., Белов Ю.А.* — обработка и анализ материала; *Сомова Л.М.* — концепция и дизайн исследования, обработка и анализ материала, написание текста, научное редактирование; *Щелканов М.Ю.* — написание текста, научное 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 10.02.2025;
принята к публикации 15.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Valeria A. Lubova — researcher, Laboratory of natural focal infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, valeri_priority@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4290-6164>

Evgeniy K. Merlov — junior researcher, Department of experimental biomedicine, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, zhenya.merlov.2000@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1515-3221>

Iurii A. Belov — junior researcher, Head, Center of molecular diagnostics, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, bornley@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Larisa M. Somova — Dr. Sci. (Med.), Professor, chief researcher, Head, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, l_somova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sci. (Biol.), Director, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Head, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Authors' contribution: *Abramova S.A.* — conceived the study and designed the experiment, material processing and performed the analysis, writing the manuscript; *Lyapun I.N., Drobot E.I., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Lubova V.A., Merlov E.K., Belov I.A.* — material processing and performed the analysis; *Somova L.M.* — conceived the study and designed the experiment, material processing and performed the analysis, writing the manuscript, science editing; *Shchelkanov M.Yu.* — writing the manuscript, science 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 10.02.2025;
accepted for publication 15.04.2025;
published 28.04.2025



Прогнозирование заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом с использованием методов математического моделирования (на примере Кировской области)

Утенкова Е.О.[✉], Княжев И.С., Щур Н.С.

Кировский государственный медицинский университет, Киров, Россия

Аннотация

Введение. Кировская область — эндемичный регион по иксодовому клещевому боррелиозу (ИКБ), что обусловлено климатическими условиями, обилием клещей и их прокормителей. Экономический ущерб от ИКБ включает затраты на лечение больных и ликвидацию природных очагов. Прогнозирование заболеваемости необходимо для планирования профилактических мероприятий (акарицидных обработок, информационно-разъяснительной работы с населением) и энтомологического мониторинга. Эффективность таких мер превышает вышеуказанные затраты, что подчёркивает актуальность исследования.

Цель исследования — изучение влияния различных факторов на заболеваемость ИКБ с использованием методов математического моделирования для дальнейшего эпидемиологического прогнозирования на примере Кировской области.

Материалы и методы. Изучены данные государственных докладов «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Кировской области» за 2006–2023 гг. по заболеваемости ИКБ, первому и последнему зарегистрированным случаям присасывания клеща к человеку и объёму акарицидных работ. Гидрометеорологические данные: среднемесячные и среднегодовые значения температуры воздуха, влажности воздуха и объёма осадков. Проводили корреляционный анализ по Спирмену и множественный регрессионный анализ, в качестве критерия статистической значимости был выбран уровень $p < 0,05$.

Результаты. Интервальный прогноз заболеваемости: к 2024 г. — до 18,67 на 100 тыс. населения, к 2025 г. — 16,51, к 2026 г. — 14,36. Выявлены корреляции между климатическими факторами и заболеваемостью ИКБ, отрицательная достоверная корреляционная связь умеренной тесноты между заболеваемостью ИКБ в Кировской области и объёмом акарицидных работ. Разработаны две модели прогнозирования: на основе сроков первого и последнего зарегистрированных случаев присасывания клещей; на основе гидрометеорологических факторов и объёма акарицидных работ.

Заключение. Заболеваемость ИКБ в Кировской области характеризуется тенденцией к снижению. Предложены математические модели для прогнозирования заболеваемости ИКБ в Кировской области.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, заболеваемость, математическая модель, абиотические факторы, биотические факторы, антропогенные факторы

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: Утенкова Е.О., Княжев И.С., Щур Н.С. Прогнозирование заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом с использованием методов математического моделирования (на примере Кировской области). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):179–189.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-647>

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

Prediction of the incidence of lyme disease using mathematical modeling methods (using the example of the Kirov region)

Elena O. Utenkova[✉], Ilya S. Knyazhev, Nikolay S. Shchur

Kirov State Medical University, Kirov, Russia

Annotation

Introduction. The Kirov region is an endemic region for Lyme disease (ixodic tick-borne borreliosis), which is caused by climatic conditions, an abundance of ticks and their feeders. The economic damage caused by Lyme disease includes the cost of treating patients and eliminating natural foci. Morbidity forecasting is necessary for planning preventive measures (acaricide treatments, awareness-raising activities with the population) and entomological monitoring. The effectiveness of such measures exceeds the above costs, which underlines the relevance of the study.

The **aim** of the study is to analyze the influence of various factors on the incidence of Lyme disease using mathematical modeling methods for further epidemiological forecasting using the example of the Kirov region.

Materials and methods. The data of the state reports «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Kirov region» for 2006–2023 on the incidence of Lyme disease, the first and last reported cases of tick attachment to humans and the volume of acaricide treatments were studied. Hydrometeorological data: monthly and annual averages of air temperature, humidity, and precipitation. Spearman correlation analysis and multiple regression analysis were performed using the «Excel MS Office-2021» and «Statistica Advanced 12 for Windows RU» software. The level of $p < 0.05$ was chosen as a criterion of statistical significance.

Results. The interval forecast of incidence is up to 18.67 by 2024, 16.51 by 2025, and 14.36 per 100,000 population by 2026. Correlations between climatic factors and morbidity have been identified. A negative reliable correlation of moderate density was revealed between the incidence of Lyme disease in the Kirov region and the volume of acaricide treatments. Two forecasting models have been developed: based on the timing of the first and last reported cases of tick bites; based on hydrometeorological factors and the volume of acaricide treatment.

Conclusion. The incidence of Lyme disease in the Kirov region is characterized by a downward trend. Mathematical models for predicting morbidity in the Kirov region are proposed.

Keywords: *Lyme disease, morbidity, mathematical model, abiotic factors, biotic factors, anthropogenic factors*

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: Utenkova E.O., Knyazhev I.S., Shchur N.S. Prediction of the incidence of lyme disease using mathematical modeling methods (using the example of the Kirov region). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):179–189.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-647>

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

Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — природно-очаговое зоонозное заболевание с трансмиссивным механизмом передачи, вызываемое бактериями рода *Borrelia* семейства *Spirochaetaceae*, передающимися клещами рода *Ixodes*. В эпидемиологическом аспекте значение имеют клещи *I. persulcatus* и *I. ricinus*, не исключается роль иных видов [1–3]. Кировская область расположена на севере Приволжского федерального округа и характеризуется наиболее высоким уровнем заболеваемости ИКБ не только в округе, но и в России [4]. Большая часть территории исследуемого субъекта располагается в зоне средней и южной тайги, которая характеризуется благоприятными условиями для жизнедеятельности клещей — переносчиков боррелий и их прокормителей [5]. Природно-очаговые инфекции, к числу которых относится ИКБ, являются климатозависимыми, поскольку вариация погодных условий не только влияет на среду обитания клещей, расширяя их ареал, но и оказывает воздействие на их жизнедеятельность. Высокая среднегодовая температура, тёплые межсезонья, обилие атмосферных осадков, повышенная влажность воздуха и почвы, возросшая интенсивность солнечной радиации способствуют выживаемости,

ранней активизации, размножению, продлению периода активности клещей [6–9]. Анализ влияния абиотических, биотических и антропогенных факторов на клещевую популяцию играет ключевую роль для эпидемиологического надзора, т. к. позволяет прогнозировать активность и распространение клещей, оптимизировать профилактические мероприятия и снижать риски массового заражения населения [4, 10–16]. Принимая во внимание вышеперечисленные факты, становится понятным, что клещевые инфекции являются серьёзной угрозой как для здоровья населения, так и для экономики региона. Высокая интенсивность эпидемического процесса ИКБ может привести к значительным финансовым потерям из-за расходов на оказание медицинской помощи, увеличению сроков временной нетрудоспособности, отдалённым осложнениям и снижению эффективности производственного сектора [17–19].

Всё вышеперечисленное делает актуальным прогнозирование уровня заболеваемости ИКБ. Предсказание очередного подъёма заболеваемости ИКБ позволит своевременно произвести комплекс предупредительных мероприятий: акарицидные обработки территорий и информирование населения о мерах защиты. Экономическая выгода и эффек-

тивность таких мероприятий значительно превышает затраты на ликвидацию природных очагов и лечение больных [10, 14–16, 20].

Цель исследования — изучение влияния различных факторов на заболеваемость ИКБ с использованием методов математического моделирования для дальнейшего прогнозирования заболеваемости ИКБ на примере Кировской области.

Материалы и методы

Для ретроспективного анализа заболеваемости ИКБ в Кировской области использовали данные государственных докладов Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Кировской области «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Кировской области» за 2006–2023 гг. по показателям: заболеваемость ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области, первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку (февраль, март и апрель) с 2006 по 2023 г., последний зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку (сентябрь, октябрь и ноябрь) с 2006 по 2023 г. и объём акарицидных работ (га).

В качестве гидрометеорологических данных были использованы данные архива погоды аэропорта Победилово по месяцам (январь–декабрь) за 2006–2023 гг.: среднемесячные и среднегодовые значения температуры воздуха (°C), влажности воздуха (%) и объёма осадков (мм) за 2006–2023 гг. Результаты обрабатывали с применением методов математической статистики с использованием стандартных пакетов программного обеспечения «Excel MS Office-2021» и «Statistica Advanced 12 for Windows RU». Для установления связей между изучаемыми величинами применяли корреляцион-

ный анализ по Спирмену. Для оценки возможности прогнозирования использовали множественный регрессионный анализ. В качестве критерия статистической значимости был выбран уровень $p < 0,05$, что соответствует 5% вероятности ошибки первого рода.

Результаты

В 2006–2023 гг. эпидемический процесс в Кировской области характеризовался тенденцией к снижению заболеваемости ИКБ (**рис. 1**). Так, наблюдается снижение заболеваемости ИКБ в Кировской области — ежегодно в среднем на 2,2 на 100 тыс. населения ($R^2 = 0,660$).

Показатели динамического ряда заболеваемости ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области отражены в **табл. 1**.

Проведено прогнозирование заболеваемости ИКБ в Кировской области до 2026 г. С вероятностью ошибки 5% можно утверждать, что уровень заболеваемости ИКБ в среднем на 2024 г. составит до 18,67 на 100 тыс. населения, на 2025 г. — до 16,51, на 2026 г. — до 14,36 (**рис. 2**).

Для изучения влияния сроков начала и окончания эпидемического сезона (периода активной жизнедеятельности клещей — переносчиков боррелий) на заболеваемость ИКБ в Кировской области построена модель множественной линейной регрессии, где переменной выступал: y_i — заболеваемость ИКБ в Кировской области на 100 тыс. населения. Факторы: x — временной фактор (период с 2006 по 2023 г.), первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку (февраль, март и апрель) с 2006 по 2023 г., последний зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку (сентябрь, октябрь и ноябрь) с 2006 по 2023 г. Поскольку в модели использовались качественные признаки,

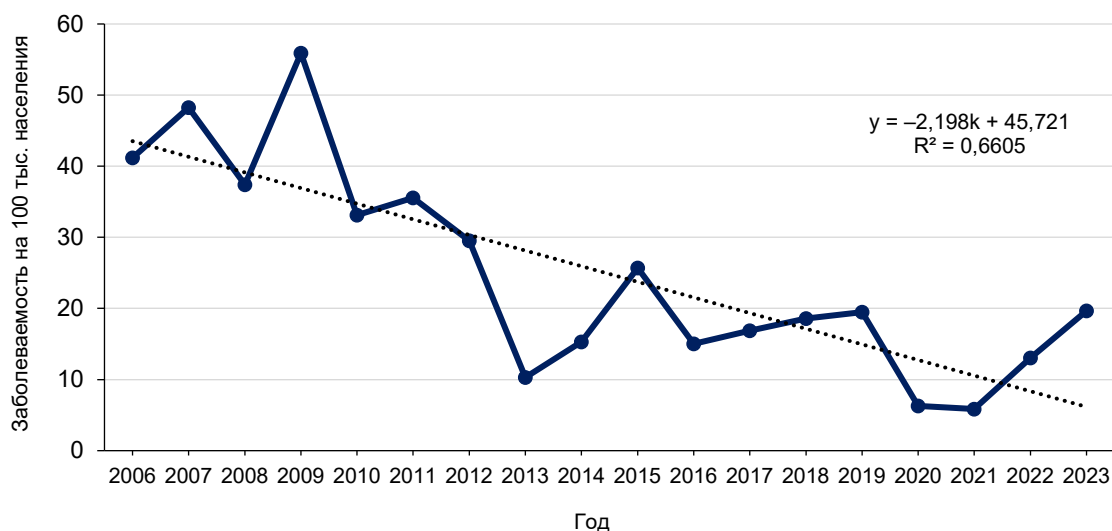


Рис. 1. Динамика заболеваемости ИКБ в Кировской области в 2006–2023 гг.

Таблица 1. Показатели динамического ряда заболеваемости ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области

Год	Зарегистрированная заболеваемость ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области	Абсолютный прирост	Темп прироста, %	Значение 1% прироста	Темп роста, %
2006	41,19	–	–	–	–
2007	48,24	7,1	17,1	41,19	117,1
2008	37,42	–10,8	–22,4	48,24	77,6
2009	55,9	18,5	49,4	37,42	149,4
2010	33,11	–22,8	–40,8	55,90	59,2
2011	35,57	2,5	7,4	33,11	107,4
2012	29,52	–6,1	–17,0	35,57	83,0
2013	10,3	–19,2	–65,1	29,52	34,9
2014	15,31	5,0	48,6	10,30	148,6
2015	25,71	10,4	67,9	15,31	167,9
2016	15,03	–10,7	–41,5	25,71	58,5
2017	16,88	1,9	12,3	15,03	112,3
2018	18,58	1,7	10,1	16,88	110,1
2019	19,48	0,9	4,8	18,58	104,8
2020	6,29	–13,2	–67,7	19,48	32,3
2021	5,86	–0,4	–6,8	6,29	93,2
2022	13,04	7,2	122,5	5,86	222,5
2023	19,68	6,6	50,9	13,04	150,9
2023/2006	–	–21,5	–52,2	41,19	47,8

вводили фиктивные переменные: z_1 (1 — при значении фактора март, 0 — при остальных значениях фактора); z_2 (1 — при значении фактора апрель, 0 — при остальных значениях фактора); h_1 (1 — при значении фактора сентябрь, 0 — при остальных значениях фактора); h_2 (1 — при значении фактора октябрь, 0 — при остальных значениях фактора). Математическая модель: $y_t = 4433,314 - 2,190x + 9,614z_1 + 4,629z_2 - 19,565h_1 - 3,617h_2$ (табл. 2). Коэффициент детерминации равен $R^2 = 0,718$. Это означает, что уровень заболеваемости ИКБ на 71,8%

определяется факторами x, z_1, z_2, h_1, h_2 и на 28,2% — неучтёнными факторами. Коэффициент Фишера $< 0,05$, на уровне 5% модель признается значимой. На уровне 5% фактор x значим. Можно говорить о том, что с каждым годом заболеваемость ИКБ в Кировской области снижается в среднем на 2,19 на 100 тыс. населения. Поскольку в модели использовались качественные признаки: первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку (февраль, март и апрель) с 2006 по 2023 г., последний зарегистрированный случай присасывания клеща

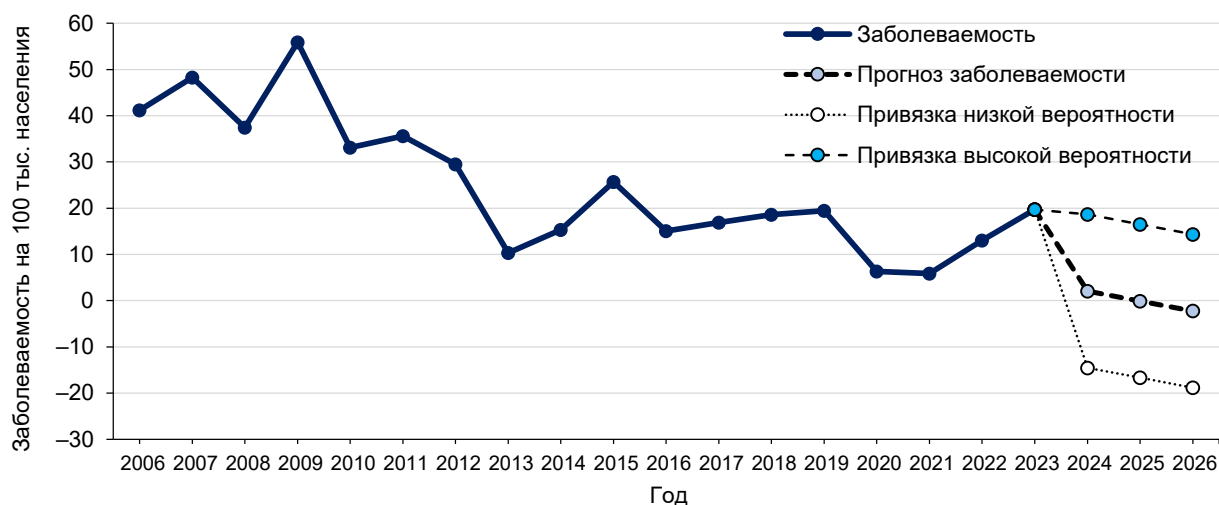
**Рис. 2.** Диаграмма интервального прогноза заболеваемости ИКБ в Кировской области до 2026 г.

Таблица 2. Стандартизированные β -коэффициенты для модели множественной регрессии

Фактор	β^*	SE of β^*	β	SE of β	t(69)	p-value
Intercept	–	–	4433,314	904,802	4,900	0,000
x	–0,810	0,165	–2,190	0,447	–4,905	0,000
z_1	0,340	0,316	9,614	8,925	1,077	0,303
z_2	0,165	0,314	4,629	8,804	0,526	0,609
h_1	–0,319	0,149	–19,565	9,155	–2,137	0,054
h_2	–0,115	0,174	–3,617	5,443	–0,664	0,519

Примечание. Intercept — свободный член уравнения регрессии; β^* — стандартизированный коэффициент регрессии; SE of β^* — стандартная ошибка стандартизованного коэффициента регрессии; β — коэффициент регрессии; SE of β — стандартная ошибка коэффициента регрессии; t(69) — расчётное значение t-критерия для оценки значимости коэффициента регрессии; p-value — уровень значимости.

Таблица 3. Поправочные коэффициенты регрессии

Значение фактора	β	$\beta^{\text{попр}} = \beta - \Delta$	Значение фактора	β	$\beta^{\text{попр}} = \beta - \Delta$
Первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в феврале	0,000	–4,750	Последний зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в сентябре	–19,565	–11,840
Первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в марте	9,614	4,870	Последний зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в октябре	–3,617	4,110
Первый зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в апреле	4,629	–0,120	Последний зарегистрированный случай присасывания клеща к человеку в ноябре	0,000	7,730
Сумма	14,24	–	Сумма	–23,18	–
Δ	4,75	–	Δ	–7,73	–

Примечание. β — коэффициент регрессии; $\beta^{\text{попр}}$ — поправочный коэффициент регрессии.

ща к человеку (сентябрь, октябрь, ноябрь) с 2006 по 2023 г., вводились поправочные коэффициенты перед фиктивными переменными (табл. 3). Заболеваемость ИКБ в Кировской области на 100 тыс. населения в системе изменяется: при первом зарегистрированном случае присасывания клеща к человеку в феврале заболеваемость ИКБ ниже среднего, в марте — выше среднего, в апреле — ниже среднего; при последнем зарегистрированном слу-

чае присасывания клеща к человеку в сентябре заболеваемость ИКБ ниже среднего, в октябре и ноябре — выше среднего.

В Кировской области наблюдается тенденция к увеличению площадей, подлежащих акарицидной обработке (рис. 3). На основании значения коэффициента регрессии можно сделать вывод о том, что с каждым годом объём акарицидных работ по Кировской области увеличивается в среднем на 125,87 га.

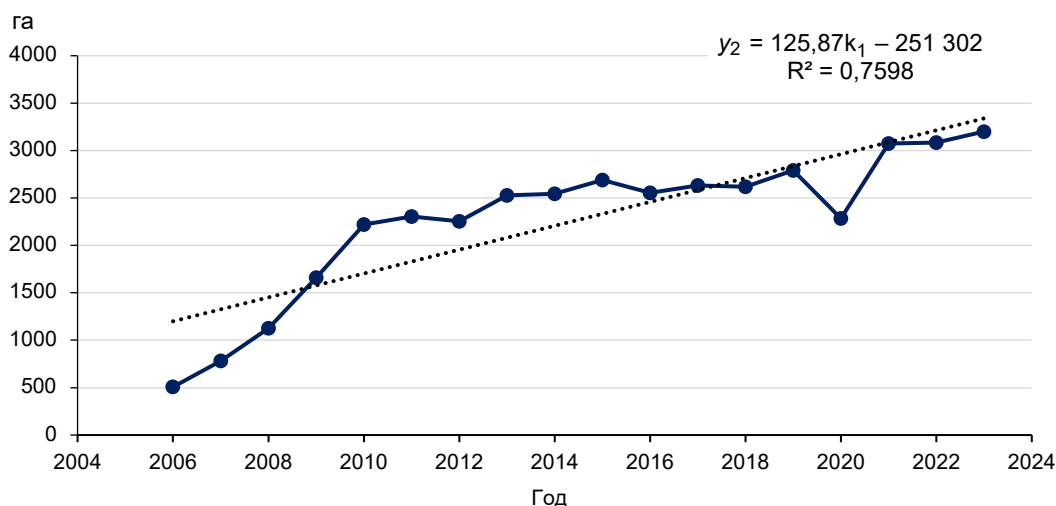


Рис. 3. Объём акарицидных работ в Кировской области в 2006–2023 гг.

Показатели динамического ряда объёма акарицидных работ в Кировской области отражены в **табл. 4**.

Построена корреляционная матрица зависимости заболеваемости ИКБ по Кировской области на 100 тыс. населения с 2006 по 2023 г. от гидрометеорологических факторов (по месяцам) и объёма акарицидных работ (**табл. 5**). Выявлены сильная отрицательная связь заболеваемости ИКБ с временным фактором, а также отрицательные связи средней силы между заболеваемостью ИКБ и объёмом акарицидных работ. Между заболеваемостью ИКБ и температурой воздуха в сентябре обнаружена средняя положительная корреляционная связь ($r = 0,51$; $p < 0,05$). Между влажностью воздуха в июне и августе и заболеваемостью ИКБ выявлены слабые положительные корреляционные связи ($r = 0,47$; $p < 0,05$ и $r = 0,47$; $p < 0,05$ соответственно). Выявлены слабая положительная корреляционная связь между объёмом осадков за декабрь и заболеваемостью ИКБ ($r = 0,49$; $p < 0,05$), средние положительные связи между объёмом осадков за июнь, август и ноябрь и заболеваемостью ИКБ ($r = 0,52$; $p < 0,05$; $r = 0,68$; $p < 0,05$ и $r = 0,66$; $p < 0,05$ соответственно), а также сильная положительная связь между объёмом осадков за октябрь и заболеваемостью ИКБ ($r = 0,75$; $p < 0,05$).

Построена корреляционная матрица зависимости заболеваемости ИКБ (на 100 тыс. населения) по Кировской области от среднегодовых значений гидрометеорологических факторов (температура и влажность воздуха, объём осадков за 2006–2023 гг.) и объёма акарицидных работ (**табл. 6**).

Для множественного регрессионного анализа результативной переменной использован показатель y_3 — заболеваемость ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области. Выборочные коэффициенты корреляции представлены в табл. 6. Факторные признаки и модель: v_1 — объём акарицидных работ (га); v_2 — среднегодовая температура воздуха ($^{\circ}\text{C}$); v_3 — среднегодовая влажность воздуха (%); v_4 — среднегодовой объём осадков (мм); $y_3 = -70,117 - 0,003v_1 - 1,304v_2 + 0,993v_3 + 93,133v_4$. Уравнение регрессии является статистически достоверным на уровне значимости $p < 0,05$. Доля вариации заболеваемости ИКБ на 75,1% объясняется вариацией факторных признаков ($R^2 = 0,751$).

На основании стандартизированных β -коэффициентов проведена оценка влияния факторов на зависимую переменную (**табл. 7**). Заболеваемость ИКБ в Кировской области на 100 тыс. населения в системе изменяется:

- при увеличении объёма акарицидных работ в среднем заболеваемость ИКБ снижается;
- увеличение среднегодовой температуры воздуха в среднем приводит к снижению заболеваемости ИКБ;
- увеличение среднегодовой влажности воздуха в среднем приводит к увеличению заболеваемости ИКБ;
- при увеличении среднегодового объёма осадков в среднем заболеваемость ИКБ увеличивается.

Таблица 4. Показатели динамического ряда объёма акарицидных работ в Кировской области

Год	Объём акарицидных работ в Кировской области, га	Абсолютный прирост, га	Темп прироста, %	Значение 1% прироста	Темп роста, %
2006	507,0	–	–	–	–
2007	782,7	275,7	54,4	507,00	154,4
2008	1125,0	342,3	43,7	782,70	143,7
2009	1660,5	535,5	47,6	1125,00	147,6
2010	2220,6	560,1	33,7	1660,50	133,7
2011	2303,4	82,8	3,7	2220,60	103,7
2012	2253,0	–50,4	–2,2	2303,40	97,8
2013	2526,3	273,3	12,1	2253,00	112,1
2014	2545,7	19,5	0,8	2526,27	100,8
2015	2688,4	142,7	5,6	2545,73	105,6
2016	2553,7	–134,7	–5,0	2688,44	95,0
2017	2633,2	79,5	3,1	2553,72	103,1
2018	2617,7	–15,5	–0,6	2633,20	99,4
2019	2790,8	173,1	6,6	2617,70	106,6
2020	2284,3	–506,5	–18,1	2790,80	81,9
2021	3075,3	791,0	34,6	2284,30	134,6
2022	3083,0	7,7	0,3	3075,26	100,3
2023	3200,7	117,7	3,8	3083,00	103,8
2023/2006	–	2693,7	531,3	507,00	631,3

Таблица 5. Корреляционная матрица зависимости заболеваемости ИКБ по Кировской области на 100 тыс. населения с 2006 по 2023 г. от среднемесячных значений гидрометеорологических факторов и объёма акарицидных работ

Показатель	Заболеваемость ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Временной фактор, годы	-0,77	< 0,05
Объём акарицидных работ, га	-0,64	< 0,05
Температура воздуха, °С		
в январе	-0,28	> 0,05
в феврале	-0,41	> 0,05
в марте	0,18	> 0,05
в апреле	-0,29	> 0,05
в мае	-0,10	> 0,05
в июне	-0,15	> 0,05
в июле	-0,16	> 0,05
в августе	-0,19	> 0,05
в сентябре	0,51	< 0,05
в октябре	0,15	> 0,05
в ноябре	-0,11	> 0,05
в декабре	0,24	> 0,05
Влажность воздуха, %		
в январе	0,22	> 0,05
в феврале	-0,28	> 0,05
в марте	0,36	> 0,05
в апреле	0,15	> 0,05
в мае	-0,15	> 0,05
в июне	0,47	< 0,05
в июле	0,35	> 0,05
в августе	0,47	< 0,05
в сентябре	-0,04	> 0,05
в октябре	0,05	> 0,05
в ноябре	0,45	> 0,05
в декабре	0,20	> 0,05
Объём осадков, мм		
в январе	0,50	< 0,05
в феврале	0,03	> 0,05
в марте	0,43	> 0,05
в апреле	0,36	> 0,05
в мае	0,47	> 0,05
в июне	0,52	< 0,05
в июле	0,24	> 0,05
в августе	0,68	< 0,05
в сентябре	0,40	> 0,05
в октябре	0,75	< 0,05
в ноябре	0,66	< 0,05
в декабре	0,49	< 0,05

Обсуждение

Заболеваемость ИКБ в Кировской области в 2006–2023 гг. была неравномерной. При сравнении заболеваемости в 2023 г. с 2006 г. отмечается снижение интенсивности проявления эпидемического процесса (на 100 тыс. населения) на 52,2%. Наиболее значительные изменения наблюдаются в 2009 г. (рост на 49,4%) и в 2013 г. (снижение на 65,1%). Рост заболеваемости ИКБ в 2009 г. (на 49,4%) можно объяснить удлинением сезона активности клещей: в среднем по области составил 208 дней, что на 14 дней больше по сравнению с 2008 г. (194 дня), увеличением численности и активности переносчиков, о чём косвенно свидетельствует рост числа обращений в лечебно-профилактические учреждения по поводу присасывания клещей в 1,6 раза (с 13 432 человек в 2008 г. до 21 477 человек в 2009 г.) и недостаточным объёмом акарицидных работ (в 2 раза ниже требуемого)¹. Снижение заболеваемости ИКБ в 2013 г. (на 65,1%) можно объяснить увеличением объёма акарицидных работ в 1,5 раза (2526,3 га в 2013 г. в сравнении с 1660,5 га в 2009 г.), уменьшением численности и активности переносчиков, о чём косвенно свидетельствует снижение числа обращений по поводу присасывания клещей практически в 3 раза (с 21 477 человек в 2009 г. до 7219 человек в 2009 г.) и мероприятиями по борьбе с грызунами². Несмотря на общую тенденцию к снижению, динамика заболеваемости остаётся нестабильной. После значительного падения в 2013 г. в последующие годы наблюдается постепенный рост, который снова сменяется снижением в 2020 г., что может быть связано с пандемией COVID-19³. Динамика заболеваемости за 2005–2009 гг. объясняется удлинением сезона активности клещей вследствие тёплого и длительного осеннего периода, в условиях которого люди чаще занимались сбором дикорастущих растений в природных биотопах, продолжали работы на садово-огородных участках, что вело к увеличению контактов населения с клещами [7–9, 21, 22].

Интервальный прогноз заболеваемости ИКБ в Кировской области на период с 2024 по 2026 г. демонстрирует тенденцию к снижению. Наблюдается уменьшение интенсивности проявлений эпидемического процесса может объясняться увеличением объёма акарицидных работ, изменением

¹ Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Кировской области в 2009 году». URL: <https://www.43.rospotrebnadzor.ru/documents/gosregdoklad/publications/svoddokl2009.pdf>

² Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Кировской области в 2013 году». URL: <https://www.43.rospotrebnadzor.ru/documents/gosregdoklad/publications/svoddokl2013.pdf>

³ Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Кировской области в 2020 году». URL: <https://www.43.rospotrebnadzor.ru/documents/gosregdoklad/publications/gosudarstvennyy-doklad-2020.pdf>

Таблица 6. Корреляционная матрица зависимости заболеваемости ИКБ (на 100 тыс. населения) по Кировской области от среднегодовых значений гидрометеорологических факторов и объёма акарицидных работ

Коррелируемые показатели	Заболеваемость ИКБ	Объём акарицидных работ, га	Температура воздуха, °С	Влажность воздуха, %	Объём осадков, мм
Заболеваемость ИКБ	1,00	-0,64	-0,03	0,35	0,74
Объём акарицидных работ, га	-0,64	1,00	-0,20	-0,10	-0,69
Температура воздуха, °С	-0,03	-0,20	1,00	0,19	-0,06
Влажность воздуха, %	0,35	-0,10	0,19	1,00	0,40
Объём осадков, мм	0,74	-0,69	-0,06	0,40	1,00

Таблица 7. Стандартизированные β -коэффициенты регрессионной модели

Фактор	β^*	SE of β^*	β	SE of β	t(69)	p-value
Intercept	–	–	-70,117	56,530	-1,240	0,237
v_1	-0,147	0,218	-0,003	0,004	-0,675	0,512
v_2	-0,083	0,125	-1,304	1,955	-0,667	0,517
v_3	0,167	0,128	0,993	0,758	1,310	0,213
v_4	0,715	0,224	93,133	29,210	3,188	0,007

Примечание. Intercept — свободный член уравнения регрессии; β^* — стандартизированный коэффициент регрессии; SE of β^* — стандартная ошибка стандартизованного коэффициента регрессии; β — коэффициент регрессии; SE of β — стандартная ошибка коэффициента регрессии; t(69) — расчётное значение t-критерия для оценки значимости коэффициента регрессии; p-value — уровень значимости.

погодных условий (тенденция к снижению среднегодового объёма осадков). Следует отметить, что нельзя исключить влияние других факторов.

Раннее или, наоборот, позднее начало активизации иксодовых клещей может приводить к изменению сроков наступления эпидемического сезона [10–13]. Удлинение сезона активности клещей является следствием тёплого и длительного осеннего периода [21]. Используя метод множественной линейной регрессии, мы предложили математическую модель заболеваемости ИКБ по Кировской области на 100 тыс. населения, для прогнозирования которой использовались такие показатели, как первый и последний зарегистрированные случаи присасывания клеща к человеку за 2006–2023 гг. При первом зарегистрированном случае в феврале заболеваемость ИКБ была ниже среднего на 4,75 на 100 тыс. населения, в марте — выше среднего на 4,87, в апреле — ниже среднего на 0,12. При последнем зарегистрированном случае присасывания клеща к человеку в сентябре заболеваемость ИКБ — ниже среднего на 11,84 на 100 тыс. населения, в октябре и ноябре — выше среднего на 4,11 и 7,73 соответственно. Следует заметить, что любой прогноз не может быть абсолютным, т. к. никогда нельзя полностью исключить влияние других факторов. Примером может являться 2020 г., когда первый пострадавший от присасывания клеща человек был зарегистрирован в феврале, но заболеваемость ИКБ в Кировской области в этот год была низкой. В данном случае нельзя исключить влияние противоэпидемических мероприятий, связанных с пандемией COVID-19.

Площадь акарицидных обработок в 2010 г. в сравнении с 2006 г. увеличилась в 4,4 раза — с 507 до 2220,5 га [9]. Проведённый нами статистический анализ за 2006–2023 гг. показал, что объём акарицидных работ по Кировской области ежегодно увеличивался в среднем на 125,87 га. Выявлена отрицательная достоверная корреляционная связь умеренной тесноты между заболеваемостью ИКБ в 2006–2023 гг. и объёмом акарицидных работ в этот период.

Биотические факторы играют не менее существенную роль в жизненном цикле клещей. Многие позвоночные: зайцы, копытные, грызуны, птицы — служат прокормителями для клещей и резервуаром для возбудителей клещевых инфекций. Увеличение численности животных прямо коррелирует со скоростью роста популяции иксодовых клещей [4, 23–25]. Антропогенные факторы следует рассматривать с позиции ведения хозяйственной деятельности и поведения человека в природе. Активная вырубка лесных массивов ведёт к динамическому изменению микроклиматических условий. Смена старого леса на молодую поросль обуславливает увеличение экспозиции солнечным светом, изменение температуры, влажности воздуха и верхних слоев почвы. Вырубленные участки заселяются мелколиственными породами деревьев, кустарниками, травами, создающими благоприятную нишу для размножения прокормителей и переносчиков клещей [24, 25]. Снижение видовой биоразнообразия отдельной экосистемы, влекущее нарушение пищевых цепей, связано с повышенной вероятностью

инфицирования клещей. Так, сокращение ключевого хищника мелких млекопитающих — рыжей лисицы на северо-востоке и западе США обусловило рост заболеваемости ИКБ в данном регионе. В свою очередь активный отдых или трудовая деятельность на открытых пространствах в тёплое время года повышает вероятность контакта человека с инфицированными членистоногими переносчиками боррелий [26–29]. Эти факторы напрямую влияют на риск контакта человека с клещами, что необходимо для построения точной прогностической модели эпидемиологического риска заболеваемости населения.

Активность клещей может быть обусловлена погодными условиями [10]. Абиотические факторы оказывают значительное влияние на выживаемость и размножение клещей в конкретном биогеоценозе. Доказано, что среднегодовые температуры и сезонность их колебания играют критическую роль в жизненном цикле членистоногих [23, 25]. Так, мягкие зимы способствуют большей выживаемости особей, а тёплые межсезонья — ранней активизации и продлевают период активности клещей, что приводит к расширению ареала обитания [24, 25]. Обилие атмосферных осадков, высокая относительная влажность воздуха и степень увлажнения почвы имеют критическое значение на всех стадиях жизненного цикла клещей. Количество солнечной радиации, продолжительность светового дня положительно связаны с активностью клещей [23]. С 1984 по 2010 г. на территории Кировской области зафиксирован значительный рост среднегодовой температуры воздуха и относительной влажности воздуха. Основные изменения происходили в осенние месяцы, что благоприятно сказывалось на жизнедеятельности иксодовых клещей [27, 30]. Российскими учёными предложено регрессионное уравнение, где зависимая переменная — заболеваемость клещевым энцефалитом, а факторы — температура мая в сезон n в среднесрочном цикле, температура августа в сезон n в среднесрочном цикле, температура октября предшествующего сезона ($n - 1$) и температура ноября. По мнению авторов, ход изменения заболеваемости клещевым энцефалитом в Иркутске достаточно хорошо согласуется с ходом изменения климата в его макроциклических и трендовых составляющих. В ходе исследования, проведённого в 2011 г., установлено, что для трёх природных очагов клещевого энцефалита (расположенных на территории Новосибирска, Иркутска, Горно-Алтайска) общими значимыми факторами прогнозирования заболеваемости этой природно-очаговой инфекцией являются: влажность воздуха ноября предыдущего года, влажность апреля и июня, а также температура июня текущего года [31, 32]. Эти факторы выявлены как при построении логической решающей функции, так и при составлении уравнения регрессии. Показано положительное

влияние солнечной активности на заболеваемость клещевым энцефалитом в Новосибирске и Иркутске. Нами на основе метода множественной линейной регрессии предложена математическая модель, свидетельствующая о зависимости заболеваемости ИКБ от климатических показателей и объёма акарицидных работ. На основании значений коэффициентов регрессии заболеваемость ИКБ (на 100 тыс. населения) в Кировской области в системе изменяется:

- при увеличении объёма акарицидных работ на 1 га заболеваемость ИКБ снижается в среднем на 0,003 на 100 тыс. населения;
- увеличение среднегодовой температуры воздуха на 1°C приводит к снижению заболеваемости ИКБ в среднем на 1,304 на 100 тыс. населения;
- увеличение среднегодовой влажности воздуха на 1% приводит к увеличению заболеваемости ИКБ в среднем на 0,993 на 100 тыс. населения;
- при увеличении среднегодового объёма осадков на 1 мм заболеваемость ИКБ увеличивается в среднем на 93,133 на 100 тыс. населения.

Стоит отметить, что с вероятностью ошибки в 5% среднегодовой объём осадков значим, остальные факторы незначимы. На основании значений β -коэффициентов наибольший вклад в изменение заболеваемости ИКБ вносит среднегодовой объём осадков.

Заключение

Сегодня методы математического моделирования с успехом применяются для прогнозирования заболеваемости различными нозологическими формами инфекционных болезней. ИКБ давно стал актуальной проблемой для России в целом и особенно для регионов с высокой заболеваемостью, таких как Кировская область. Авторы впервые предприняли попытку при помощи методов математического моделирования спрогнозировать уровень заболеваемости ИКБ на территории этого субъекта в зависимости от некоторых гидрометеорологических и антропогенных факторов. Предложена математическая модель прогнозирования заболеваемости ИКБ в Кировской области в зависимости от среднегодовых значений климатических показателей и объёма акарицидных работ. Составлен интервальный прогноз заболеваемости ИКБ в Кировской области на период с 2024 по 2026 г., который демонстрирует тенденцию к снижению интенсивности проявлений эпидемического процесса. Для более точного прогнозирования уровня заболеваемости ИКБ в Кировской области необходим набор факторов, включая численность и видовое разнообразие прокормителей клещей, изменения в структуре лесных

экосистем вследствие антропогенных воздействий, активность людей в природных зонах в течение сезона повышенной активности клещей, а также географические особенности распространения клещей по административно-территориальным единицам региона с учётом гидрометеорологических показателей. Работа требует дальнейшего развития, включая определение перспектив практического применения предложенных моделей прогнозирования. Это поможет обосновать необходимость дальнейших исследований и разработать стратегии стабилизации эпидемиологической обстановки по ИКБ в Кировской области.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Mahajan V.K. Lyme disease: an overview. *Indian Dermatol. Online J.* 2023;14(5):594–604. DOI: https://doi.org/10.4103/idoj.idoj_418_22
- Рудакова С.А., Теслова О.Е., Муталинова Н.Е. и др. Эпидемиологическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2021 г. и прогноз на 2022 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022;(2):46–53. Rudakova S.A., Teslova O.E., Mutalynova N.E., et al. Epidemiological situation on tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2021 and forecast for 2022. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2022;(2):46–53. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-2-46-53> EDN: <https://elibrary.ru/xkxazol>
- Wang S.S., Liu J.Y., Wang B.Y., et al. Geographical distribution of *Ixodes persulcatus* and associated pathogens: analysis of integrated data from a China field survey and global published data. *One Health.* 2023;16:100508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100508>
- Ястребов В.К., Утенкова Е.О. Актуальные направления эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями (на примере Волго-Вятского региона). *Здоровье населения и среда обитания — ЗНУСО.* 2011;(12):25–7. Yastrebov V.K., Utenkova E.O. Actual trends of epidemiological inspection of natural foci infections (by the example of the Volga-Vyatsk region). *Public Health and Life Environment – PH&LE.* 2011;(12):25–7. EDN: <https://elibrary.ru/ooqwlr>
- Любезнова О.Н., Бондаренко А.Л., Карань Л.С. Зараженность клещей *Ixodes persulcatus* возбудителями различных заболеваний в эндемичном регионе европейской части России. *Актуальная инфектология.* 2014;(2):49–52. Lyubeznova O.N., Bondarenko A.L., Karan L.S. Infectiousness of *Ixodes persulcatus* ticks with pathogens of various diseases in endemic regions of European Russia. *Journal Infectology.* 2014;2(3):49–52. EDN: <https://elibrary.ru/thebot>
- Лопух П.С., Гладкая И.Н. Влияние природных факторов на возникновение и распространение природно-очаговых заболеваний (на примере клещевых инфекций). *Вестник БГПУ. Серия 3. Физика. Математика. Информатика. Биология. География.* 2020;(3):33–6. Lopuch P.S., Gladkaya I.N. Influence of natural factors on appearance and spreading of natural-focal diseases (on the example of tick infections). *BSPU Bulletin. Series 3, Physics. Mathematics. Biology. Geography.* 2020;(3):33–6. EDN: <https://elibrary.ru/xenxwa>
- Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Платонов А.Е., Малецкая О.В. Влияние природно-климатических факторов на эпидемиологическую ситуацию по природно-очаговым инфекциям. *Инфекция и иммунитет.* 2021;11(5):820–36. Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Platonov A.E., Maletskaya O.V. Effect of the natural and climatic factors on epidemiological situation related to natural focal infections. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2021;11(5):820–36. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-EOT-1631> EDN: <https://elibrary.ru/eqdqvj>
- Eisen R.J., Eisen L. Evaluation of the association between climate warming and the spread and proliferation of *Ixodes scapularis* in northern states in the Eastern United States. *Ticks Tick Borne Dis.* 2024;15(1):102286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102286>
- Voyiatzaki C., Papailia S.I., Venetikou M.S., et al. Climate changes exacerbate the spread of *Ixodes ricinus* and the occurrence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in Europe — how climate models are used as a risk assessment approach for tick-borne diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(11):6516. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19116516>
- Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Платонов А.Е. «Объясняющие» модели заболеваемости клещевыми инфекциями (на примере Астраханской риккетсиозной и Крымской-Конго геморрагической лихорадки). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2023;100(1):34–45. Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A., Platonov A.E. Explanatory models for tick-borne disease incidence (Astrakhan rickettsial fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever). *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023;100(1):34–45. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-344> EDN: <https://elibrary.ru/udgint>
- Gray J.S., Kahl O., Lane R.S., et al. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(5):992–1003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.006>
- Voyiatzaki C., Papailia S.I., Venetikou M.S., et al. Climate changes exacerbate the spread of *Ixodes ricinus* and the occurrence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in Europe — how climate models are used as a risk assessment approach for tick-borne diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(11):6516. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19116516>
- McVicar M., Rivera I., Reyes J.B., Gulia-Nuss M. Ecology of *Ixodes pacificus* ticks and associated pathogens in the Western United States. *Pathogens.* 2022;11(1):89. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11010089>
- Deshpande G., Beetch J.E., Heller J.G., et al. Assessing the influence of climate change and environmental factors on the top tick-borne diseases in the United States: a systematic review. *Microorganisms.* 2023;12(1):50. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010050>
- Hromníková D., Furka D., Furka S., et al. Prevention of tick-borne diseases: challenge to recent medicine. *Biologia (Bratisl.).* 2022;77(6):1533–54. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00966-9>
- Eisen L. Control of ixodid ticks and prevention of tick-borne diseases in the United States: the prospect of a new Lyme disease vaccine and the continuing problem with tick exposure on residential properties. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021;12(3):101649. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101649>
- Mac S., da Silva S.R., Sander B. The economic burden of Lyme disease and the cost-effectiveness of Lyme disease interventions: A scoping review. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210280. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210280>
- Hook S.A., Jeon S., Niesobecki S.A., et al. Economic burden of reported Lyme disease in high-incidence areas, United States, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2022;28(6):1170–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2806.211335>
- van den Wijngaard C.C., Hofhuis A., Wong A., et al. The cost of Lyme borreliosis. *Eur. J. Public Health.* 2017;27(3):538–47. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckw269>
- Жигальский О.А. Анализ методов прогнозирования заболеваемости зоонозными инфекциями. *Эпидемиология и*

- вакцинопрофилактика. 2012;(3):26–31. Zhigalsky O.A. The analysis of forecasting methods of morbidity from zoonotic infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012;(3):26–31. EDN: <https://elibrary.ru/ozinj>
21. Любезнова О.Н., Бондаренко А.Л., Опарина Л.В., Ламбринаки Е.В. Эпидемиологические особенности боррелиозной инфекции на территории Кировской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012;(6):24–8. Lyubeznova O.N., Bondarenko A.L., Oparina L.V., Lambrinaki E.V. Epidemiological features of a borrelial infection in the territory of the Kirov region. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2012;(6):24–8. EDN: <https://elibrary.ru/pvblfb>
22. Ostfeld R.S., Brunner J.L. Climate change and Ixodes tick-borne diseases of humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015;370(1665):20140051. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0051>
23. Giesen C., Cifo D., Gomez-Barroso D., et al. The role of environmental factors in Lyme disease transmission in the European Union: a systematic review. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2024;9(5):113. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9050113>
24. Radolf J.D., Strle K., Lemieux J.E., Strle F. Lyme disease in humans. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021;42:333–84. DOI: <https://doi.org/10.21775/cimb.042.333>
25. Гнатив Б.Р., Токаревич Н.К. Результаты многолетнего мониторинга клещевого вирусного энцефалита и клещевого боррелиоза в Республике Коми. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(4):707–22. Gnativ B.R., Tokarevich N.K. Long-term monitoring of tick-borne viral encephalitis and tick-borne borreliosis in the Komi Republic. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(4):707–22. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ROL-1299> EDN: <https://elibrary.ru/nxhtts>
26. Bouchard C., Dumas A., Baron G., et al. Integrated human behavior and tick risk maps to prioritize Lyme disease interventions using a 'One Health' approach. *Ticks Tick Borne Dis.* 2023;14(2):102083. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102083>
27. Steinbrink A., Brugger K., Margos G., et al. The evolving story of *Borrelia burgdorferi sensu lato* transmission in Europe. *Parasitol. Res.* 2022;121(3):781–803. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07445-3>
28. Dantas-Torres F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2015;4(3):452–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>
29. Millien V., Leo S.S.T., Turney S., Gonzalez A. It's about time: small mammal communities and Lyme disease emergence. *Sci. Rep.* 2023;13(1):14513. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41901-z>
30. Reynolds C., Kontschán J., Takács N., et al. Shift in the seasonality of ixodid ticks after a warm winter in an urban habitat with notes on morphotypes of *Ixodes ricinus* and data in support of cryptic species within *Ixodes frontalis*. *Exp. Appl. Acarol.* 2022;88(1):127–38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-022-00756-1>
31. Коротков Ю.С., Никитин А.Я., Антонова А.М. Роль климатических факторов в многолетней динамике заболеваемости населения г. Иркутск клещевым энцефалитом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2007;(3S):121–5. Korotkov Yu.S., Nikitin A.Ya., Antonova A.M. Role of the climatic factors in long-term dynamics of tickborn encephalitis disease of Irkutsk population. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2007;(3S):121–5. EDN: <https://elibrary.ru/kjaazp>
32. Бериков В.Б., Лбов Г.С., Полякова Г.Л. и др. Анализ факторов, влияющих на заболеваемость клещевым энцефалитом, с использованием логико-вероятностных и корреляционно-регрессионных моделей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011;(6):25–34. Berikov V.B., Lbov G.S., Polyakova G.L., et al. Analysis of factors influencing the incidence of tick-borne encephalitis, using logical-and-probabilistic and correlation-regression models. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2011;(6):25–34. EDN: <https://elibrary.ru/okmurl>

Информация об авторах

Утенкова Елена Олеговна[✉] — д-р мед. наук, доцент, профессор каф. инфекционных болезней Кировского ГМУ, Киров, Россия, utelol@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7587-3437>

Княжев Илья Сергеевич — студент Кировского ГМУ, Киров, Россия, knyazhev-01@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3270-1738>

Щур Николай Степанович — студент Кировского ГМУ, Киров, Россия, k-shchur@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-9747-4872>

Участие авторов: Утенкова Е.О. — формирование идеи, разработка концепции и дизайна исследования, сбор и статистическая обработка данных, анализ и интерпретация полученных данных, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Княжев И.С., Щур Н.С. — сбор и статистическая обработка данных, анализ и интерпретация полученных данных, написание текста, 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 07.02.2025;
принята к публикации 10.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Elena O. Utenkova[✉] — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of infectious diseases, Kirov State Medical University, Kirov, Russia, utelol@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7587-3437>

Ilya S. Knyazhev — student, Kirov State Medical University, Kirov, Russia, knyazhev-01@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3270-1738>

Nikolay S. Shchur — student, Kirov State Medical University, Kirov, Russia, k-shchur@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-9747-4872>

Authors' contribution: Utenkova E.O. — idea formation, development of the concept and design of the study, data collection and statistical processing, analysis and interpretation of the data obtained, text writing, editing, approval of the final version of the article; Knyazhev I.S., Shchur N.S. — data collection and statistical processing, analysis and interpretation of the data obtained, text writing, 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 07.02.2025;
accepted for publication 10.04.2025;
published 28.04.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>



Перспектива применения биофлуоресцентных белков на этапе доклинической оценки живых вакцин на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTURBOGFP-B

Клюева С.Н.[✉], Буданова А.А., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Актуальны исследования, направленные на поиск наиболее информативного и оптимизированного метода оценки приживаемости вакцинного штамма чумного микроба в организме животных, привитых против чумы.

Цель работы — оценить целесообразность использования биофлуоресцентных белков на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (EVGFP) в схемах сочетанного применения с иммуномодуляторами на этапе доклинической оценки живых вакцин.

Материалы и методы. Морских свинок иммунизировали EVGFP, выращенным при 28°C и 37°C (EVGFP28 и EVGFP37 соответственно), в сочетании с иммуномодуляторами: азоксимера бромидом (АБ) и интерферон-γ человеческим рекомбинантным (ИЧР).

Результаты. Методом люминесцентной микроскопии выявлено обсеменение (до 600 м.к. в одном поле зрения) клетками EVGFP места введения культуры во всех опытных группах на 1-е сутки. Методом проточной цитометрии *in vivo* установлено, что на 1-е сутки во всех опытных группах фагоцитарный индекс (ФИ) составлял в среднем 94,5% с последующим снижением к 4-м суткам в среднем в 4,4 раза (на 21,2%). На 4-е сутки исследования в группе EVGFP37+АБ ФИ превосходил в 1,8 раза аналогичный показатель в группе EVGFP37. Напротив, в группе EVGFP28+ИЧР ФИ снижался в 2,2 раза относительно аналогичного показателя в группе EVGFP28. Кроме того, в группах EVGFP37+АБ и EVGFP37+ИЧР на 4-е сутки ФИ в 2 раза превышали показатели в группах EVGFP28+АБ и EVGFP28+ИЧР соответственно. В группе EVGFP37 фагоцитарное число превосходило в среднем в 1,5 раза показатель в группе EVGFP28.

Заключение. Получены данные, подтверждающие зависимость исхода взаимодействия *in vivo* чумного микроба с фагоцитами селезенки от температуры выращивания бактерий, а также от присутствия АБ и ИЧР. Применение биофлуоресцентных белков, как показано на примере штамма EVGFP и метода проточной цитометрии, расширяет возможности оценки живых вакцин против чумы на доклиническом этапе.

Ключевые слова: биофлуоресцентный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B, азоксимера бромид, интерферон-γ человеческий рекомбинантный, фагоцитоз, макрофаги, нейтрофилы, люминесцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия

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 на заседании Комиссии по биоэтике Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 5 от 25.05.2023).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № 123122100020-4.

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

Для цитирования: Клюева С.Н., Буданова А.А., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Перспектива применения биофлуоресцентных белков на этапе доклинической оценки живых вакцин на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTURBOGFP-B. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2): 190–200.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>

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

Possibilities and prospects of using biofluorescent proteins at the stage of preclinical evaluation of live vaccines, using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTURBOGFP-B

Svetlana N. Klyueva[✉], Angelina A. Budanova, Aleksandr L. Kravtsov, Svetlana A. Bugorkova

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Currently, studies aimed at finding the most informative and optimized method for assessing the survival rate of the plague microbe vaccine strain in the body of animals vaccinated against plague are relevant.

Aim — to evaluate the feasibility of using biofluorescent proteins using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTurboGFP-B (EVGFP) in combination regimens with immunomodulators at the stage of preclinical evaluation of live vaccines.

Materials and methods. Guinea pigs were immunized with EVGFP grown at 28°C and 37°C (EVGFP28 and EVGFP37, respectively), in combination with immunomodulators (azoximer bromide, AB, and human recombinant interferon gamma, HRI).

Results. Fluorescence microscopy revealed seeding (up to 600 m.c. in one field of view) with EVGFP cells at the site of culture introduction in all experimental groups on the 1st day. *In vivo* flow cytometry showed that on the 1st day in all experimental groups the phagocytic index (PI) averaged 94.5%, with a subsequent decrease by the 4th day by an average of 4.4 times (21.2%). On the 4th day of the study in the EVGFP37+AB group the PI exceeded the similar indicator in the EVGFP37 group by 1.8 times. On the contrary, in the EVGFP28+HRI group the PI decreased by 2.2 times relative to the similar indicator in the EVGFP28 group. In addition, in the EVGFP37+AB and EVGFP37+HRI groups, on day 4, the PI was 2 times higher than in the EVGFP28+AB and EVGFP28+HRI groups, respectively. In the EVGFP37 group, the phagocytic number was on average 1.5 times higher than in the EVGFP28 group.

Conclusion. The obtained data confirm the dependence of the outcome of *in vivo* interaction of the plague microbe with spleen phagocytes on the temperature of bacterial growth, as well as on the presence of AB and HRI. The use of biofluorescent proteins, as shown by the example of the EVGFP strain and the flow cytometry method, expands the possibilities for assessing live plague vaccines in preclinical studies.

Keywords: *biofluorescent Y. pestis vaccine strain EV NIEG pTurboGFP-B, azoximer bromide, human recombinant interferon gamma, phagocytosis, macrophages, neutrophils, fluorescence microscopy, flow cytometry*

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 07/23/2010). The study protocol was approved at a meeting of the Bioethics Commission of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 5 of May 25, 2023).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No 123122100020-4.

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

For citation: Klyueva S.N., Budanova A.A., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. Possibilities and prospects of using biofluorescent proteins at the stage of preclinical evaluation of live vaccines, using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTURBOGFP-B. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2): 190–200.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>

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

Введение

В последние годы в биологических и медицинских исследованиях в качестве легко детектируемых маркеров микроорганизмов применяют различные флуоресцентные белки. Одним из таких белков является зелёный флуоресцентный белок GFP (green fluorescent protein), обнаруженный у медузы *Aequorea victoria* [1, 2]. Преимущества ис-

пользования белка GFP по сравнению с другими репортерными белками заключаются в его способности флуоресцировать в отсутствие какого-либо кофактора или субстрата, продолжительном сигнале, низкой метаболической токсичности, отсутствии фоновой флуоресценции. На сегодняшний день доступен и успешно используется широкий спектр различных плазмид, сконструированных на основе

GFP. Например, коммерческий вектор pTurboGFP-B обеспечивает стабильную экспрессию и быстрое созревание флуоресцентного белка [2].

Сконструированные штаммы *Yersinia pestis*, продуцирующие GFP, используют при исследовании условий формирования симбиозов с простейшими и/или моделировании взаимодействия с клетками хозяина (млекопитающие — грызуны) [3, 4], с переносчиком (блохи) [5]. Флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применяется для обнаружения *Y. pestis* в смешанных культурах, отслеживания бактерий *in vitro* и *in vivo*, установления внутриклеточной локализации клеток рекомбинантных штаммов *Y. pestis*, оценки фагоцитоза *Y. pestis* макрофагами мышей BALB/c [6–9]. Геномные технологии позволили использовать GFP в качестве молекулярного вектора для разработки вакцин против различных бактериальных и вирусных инфекций человека и животных [1, 10].

Одной из основных задач доклинических исследований при разработке живых вакцин против чумы является определение степени остаточной вирулентности (безвредности) вакцинного штамма чумного микроба по приживаемости и распространяемости в макроорганизме. Традиционно учёт приживаемости живых клеток штаммов чумного микроба проводят бактериологическим методом. Маркирование штаммов *Y. pestis* флуоресцентными белками открывает новые возможности, позволяющие проводить мониторинг микроорганизмов в условиях *in vivo* с помощью ряда других методик, к которым относятся люминесцентная микроскопия, обеспечивающая визуализацию возбудителя чумы по наличию специфического флуоресцентного свечения [3, 4], и проточная цитометрия, способствующая определению количества живых микробных клеток по параметрам светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии органов [11].

Известно, что эталонный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ приживается и размножается в органах лабораторных животных, что способствует развитию активного противочумного иммунитета [12]. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на приживаемость возбудителя чумы, способного размножаться в различных условиях, сходных со средой его обитания в теле теплокровных млекопитающих (37°C) и пойкилотермных блох (20–28°C), является температурный [13]. Температурозависимая адаптационная стратегия *Y. pestis* — существенная часть концепции преодоления бактерией механизмов врождённой иммунологической защиты, таких как фагоцитоз и индукция воспалительного ответа макрофагами и нейтрофилами [13].

Использование различных иммуномодуляторов в схеме противочумной вакцинации позволяет уменьшать антигенную нагрузку на организм,

не снижая напряжённости иммунного ответа. Так, азоксимера бромид (АБ) в сочетании с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ оказывает стимулирующее воздействие на реактивность клеток фагоцитарной системы лабораторных животных, повышает протективную активность живой противочумной вакцины почти в 3 раза и так же, как и интерферон-γ человеческий рекомбинантный (ИЧР), стимулирует антителообразование и цитокиновый ответ [14–16].

С учётом всех вышеперечисленных факторов сделана попытка расширения возможности оценки эффективности и длительности нестерильной фазы иммунного ответа, являющейся обязательным этапом формирования специфического противочумного иммунитета, за счёт использования люминесцентных белков при тестировании различных схем применения живой чумной вакцины.

Цель работы — оценить целесообразность использования биофлуоресцентных белков на примере вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B в схемах сочетанного его применения с иммуномодуляторами на этапе доклинической оценки живых вакцин.

Материалы и методы

Для создания штамма, продуцирующего GFP, был использован вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ. Ген, кодирующий синтез TurboGFP, был введён в составе коммерческой векторной плазмиды pTurboGFP-B (4103 п. н., «Evgrogen») методом электропорации согласно рекомендациям [17]. Электропорацию выполняли на приборе «Gene Pulser Xcell» («Bio-Rad») с применением стандартного протокола для прокариотических клеток. Наличие коммерческой плазмиды устанавливали по маркеру антибиотикорезистентности, высеивая штамм на пластинки агар LB с 50 мкг/мл ампициллина. Колонии просматривали невооружённым глазом, а также на люминесцентном микроскопе «Axio Lab.A1» («Carl Zeiss Microscopy GmbH»), регистрируя интенсивное флуоресцентное свечение в ультрафиолетовой области спектра. Сконструированный рекомбинантный штамм получил обозначение *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B (EVGFP) и был депонирован под номером КМ 2115 в Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали на агаре LB (pH 7,2), а биофлуоресцентный штамм EVGFP — на агаре LB (pH 7,2) с ампициллином (50 мг/мл) в течение 48 ч при 28°C. Кроме того, использовали культуру клеток EVGFP, обладающую повышенной устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу [18]. Для этого клетки EVGFP высевали из 2-суточной 28°C культуры в конечной концентрации 1×10^7 КОЕ/мл на бульон LB (pH 7,2) и культивировали в условиях аэрации при 37°C в течение

18 ч. Из культур EVGFP, выращенных при 28°C («EVGFP28») и 37°C («EVGFP37») по стандарту мутности ОСО 42-28-59-85П, готовили взвеси концентрации 4×10^9 КОЕ/мл.

Экспериментальной моделью служили морские свинки массой 250–350 г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием Роспотребнадзора. Животные были распределены на 6 опытных групп по 12 особей в каждой. Морских свинок подкожно иммунизировали штаммом EVGFP, выращенным при 28°C (1–3-я группы) и 37°C (4–6-я группы), в дозе 2×10^9 КОЕ/0,5 мл. Морским свинкам из 2-й и 5-й групп дополнительно за 1 ч до иммунизации подкожно вводили АБ («ПетроваксФарм») в концентрации 60 мкг (EVGFP28+АБ и «EVGFP37+АБ» соответственно). Биомодели 3-й и 6-й групп дополнительно получали ИЧР («Фармаклон») в концентрации 2000 МЕ (EVGFP28+ИЧР и EVGFP37+ИЧР соответственно). Контрольную, 7-ю группу составили интактные морские свинки (4 особи). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации¹ и международными принципами². Эксперименты по иммунизации животных выполняли в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»³. Программа экспериментальной работы с животными была одобрена Комиссией по биоэтике при Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 25.05.2023).

Биохимические свойства *Y. pestis* изучали с помощью стандартных биохимических тест-стрипов API («bioMérieux SA»).

Морфологию бактериальных клеток оценивали с помощью светового микроскопа «Olympus CX41» («Olympus») и цифровой камеры VZ-C31S («VideoZavr») в программе «VideoZavr v. 1.5» при увеличении $\times 40$ и 100.

Приживаемость штамма EVGFP в органах морских свинок оценивали микроскопическим и проточно-цитометрическим методами. На 1, 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза животных умерщвляли хлороформом, вскрывали и делали мазки-отпечатки внутренних органов (место введения, паховые лимфатические узлы, кровь, селезёнка, печень, лёгкие). Мазки-отпечатки органов животных просматривали в люминесцентном микроскопе «Axio LAB. A1» («Carl Zeiss») с объективом A-Plan 100x/1,25

OiI при увеличении $\times 1000$. Исследовали под микроскопом и фотографировали по 5 полей зрения на препарат. Фотографии получали с помощью камеры «AxioCam ERc5s» («Carl Zeiss»).

Для исследования приживаемости *Y. pestis* EVGFP с помощью проточной цитометрии общепринятым методом готовили взвесь клеток селезёнки в концентрации 10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640 с гентамицином (100 мкг/мл). Затем к 100 мкл полученной взвеси добавляли 1 мл разведённого в 10 раз (согласно инструкции) «BD FACS Lysing Solution» («BD Biosciences») для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов и выдерживали образцы в течение 20 мин.

Клеточные суспензии анализировали на проточном цитофлуориметре «CyAn ADP» в программе «Summit v.4.3 Built 2445». Детекцию бактерий EVGFP в фагоцитах (макрофаги и нейтрофилы) селезёнки морских свинок проводили по ранее разработанному протоколу определения показателей фагоцитарной реакции в крови человека и животных с ФИТЦ-мечеными клетками *Y. pestis* EV НИИЭГ [15, 19]. Во взвесах клеток селезёнки фагоциты дифференцировали по параметрам светорассеяния (размеру и степени гранулярности) от лимфоцитов, а затем путём гейтирования фагоцитарной популяции определяли в селезёнке процент флуоресцирующих фагоцитов (макрофаги, нейтрофилы), что соответствовало относительному содержанию активных фагоцитов (ФИ — фагоцитарный индекс, %), поглотивших *in vivo* живые клетки исследуемого биофлуоресцентного штамма чумного микроба. Среднее количество поглощённых фагоцитами бактерий (ФЧ — фагоцитарное число) оценивали по среднему значению интенсивности их свечения в зелёной области спектра (Mean), измеряемому в условных единицах интенсивности флуоресценции (каналах цитофлуориметра) [14, 19–21].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей [Q_{25} ; Q_{75}] с расчётом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

Сравнительный анализ культур исходного вакцинного штамма и вакцинного штамма с биофлуоресцентной меткой

Проведено сравнение культурально-морфологических и биохимических свойств рекомбинантного EVGFP и исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ штаммов. Установлено, что рекомбинантный штамм обладал типичной для возбудителя чумы морфоло-

¹ Приказ Минздрава России № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», 2016.

² Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, 2010.

³ Зарегистрировано в Минюсте России 15.02.2021 № 62500.

гией клеток. Клетки штамма EVGFP, несущие ген флуоресцентного белка GFP, выявляли по наличию зелёного флуоресцентного свечения бактерий. На агаре LB с ампициллином штамм EVGFP формировал характерный R-тип колоний жёлто-зелёного цвета (**рис. 1**).

Характерными признаками роста возбудителя чумы в жидкой питательной среде являлись прозрачный бульон и рыхлый, порошковидный или хлопьевидный осадок на дне пробирки, легко распадающийся при встряхивании. На основании проведённого анализа биохимических свойств установлено, что рекомбинантный штамм EVGFP по своим характеристикам не отличался от исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ. Оба штамма ферментировали глюкозу, маннит, арабинозу, не разлагали инозит, сорбит, рамнозу, сахарозу, мелибиозу и амигдалин.

Введение морским свинкам штамма EVGFP в массивной дозе 2×10^9 КОЕ не вызывало гибели биомоделей за весь период наблюдения.

Таким образом, исследуемый штамм EVGFP по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам не отличался от исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также по признаку безвредности соответствовал эталонному вакцинному штамму.

*Оценка приживаемости *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP методом люминесцентной микроскопии*

При микроскопическом исследовании клетки EVGFP были выявлены в мазках-отпечатках только из места введения культуры во всех группах иммунизированных морских свинок и только в 1-е сутки иммунного ответа (**рис. 2**). Клет-

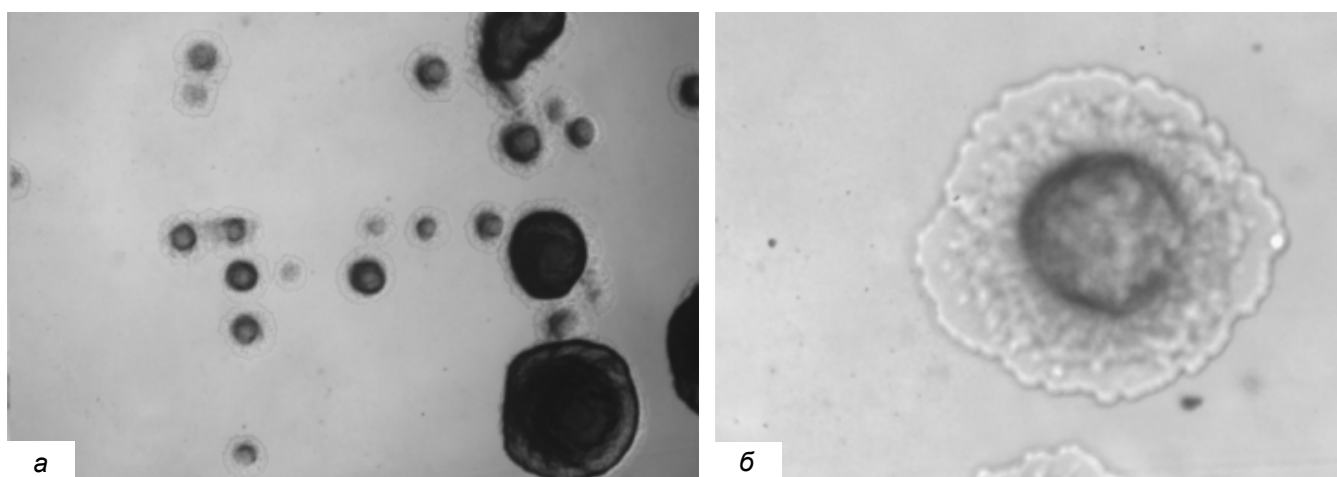


Рис. 1. R-тип колоний *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B, $\times 40$ (а) и $\times 100$ (б).

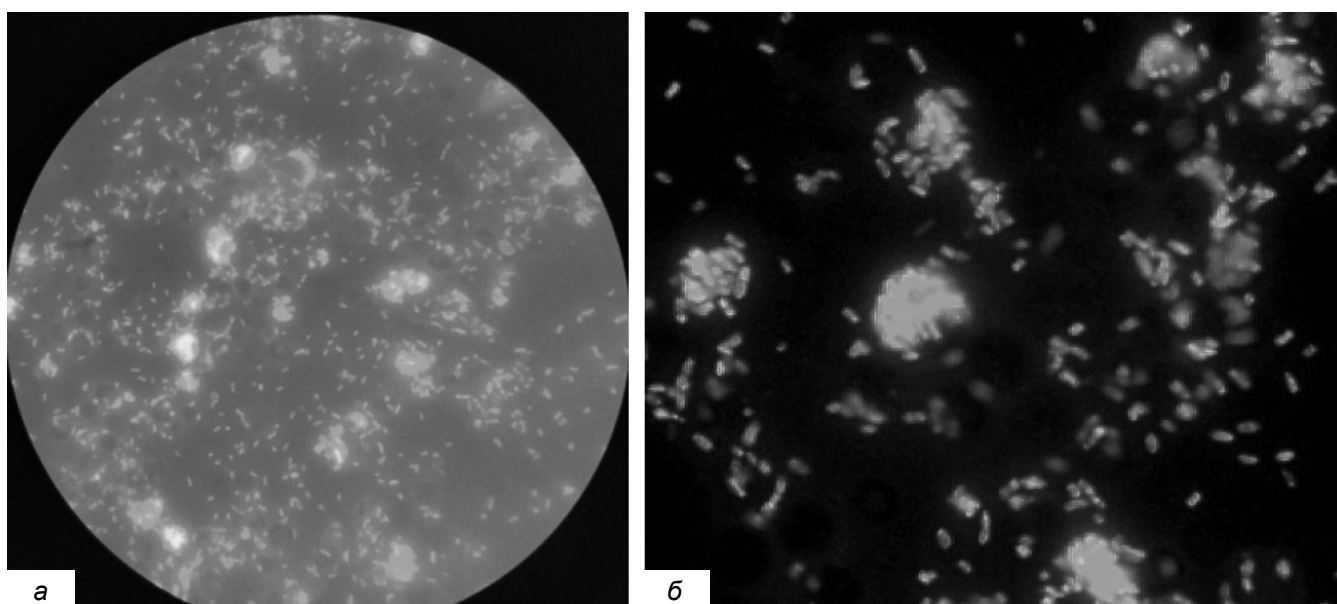


Рис. 2. Детекция клеток биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B в мазках-отпечатках морской свинки (место введения) на 1-е сутки иммунного ответа при увеличении $\times 1000$.

а — изображение в окуляре микроскопа; б — изображение с монитора компьютера.

ки флуоресцирующего штамма визуализировали в виде ярко-зелёных палочек. Количество бактерий составляло 400 ± 100 м. к. в одном поле зрения, что свидетельствовало об обильном обсеменении клетками EVGFP места введения. При дальнейшем наблюдении на 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза в мазках-отпечатках всех исследуемых органов морских свинок клетки рекомбинантного штамма не регистрировали.

*Оценка приживаемости *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP с использованием проточно-цитофлуориметрической технологии*

Принимая во внимание тот факт, что нейтрофилы и макрофаги селезёнки являются одними из основных объектов для оценки фагоцитоза и приживаемости *Y. pestis* [11], целесообразно было для цитометрических исследований использовать клетки селезёнки морских свинок.

По интенсивности сигнала флуоресценции белка GFP определяли присутствие EVGFP в популяции фагоцитов селезёнки (макрофаги и нейтрофилы), а также учитывали показатели фагоцитарной реакции *in vivo*. Гистограммы на рис. 3, б–д демонстрируют динамику снижения в селезёнке относительного числа фагоцитов, характеризующихся интенсивной зелёной флуоресценцией, обусловленной поглощением клеток штамма EVGFP, выращенного при 37°C.

На рис. 3 наглядно видно, что в интервале от 1-х до 4-х суток доля флуоресцирующих фагоцитов снижалась с 94,54 до 21,23%, а к 14-м суткам — до 0, т. е. до значений, характерных для фагоцитов селезёнки интактных (контрольных) животных, не обладающих флуоресцентным свечением в зелёной области спектра (рис. 3, е).

Сравнительная оценка влияния иммуномодулирующих препаратов при сочетанном применении с биофлуоресцентным штаммом и условий его культивирования на фагоцитарную активность клеток селезёнки

На следующем этапе проводили анализ эффективности применения препаратов на исход взаимодействия исследуемого штамма EVGFP с фагоцитами селезёнки морских свинок в условиях *in vivo*. На 4-е сутки иммуногенеза установлено достоверное снижение ФИ в группе EVGFP28+ИЧР по сравнению с аналогичным показателем в группе EVGFP28 (таблица).

В группе EVGFP37+ИЧР показатель ФИ регистрировали на уровне аналогичного показателя в группе EVGFP37. В те же сроки (4-е сутки) в группе EVGFP37+АБ ФИ достоверно повышался ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в группе EVGFP37. Выявлено достоверное увеличе-

ние показателя ФЧ в группе EVGFP28+АБ на 4-е и 7-е сутки, а в группе EVGFP28+ИЧР на 7-е сутки в сравнении с данным показателем в группе EVGFP28 ($p < 0,05$).

Далее определяли влияние температуры культивирования EVGFP на способность фагоцитов селезёнки морских свинок поглощать и переваривать клетки флуоресцентного штамма. В группах EVGFP37+АБ и EVGFP37+ИЧР на 4-е сутки показатели ФИ в 2 раза превышали ($p < 0,05$) аналогичные показатели в группах EVGFP28+АБ и EVGFP28+ИЧР соответственно. В группе EVGFP37 на 4-е сутки показатель ФЧ превосходил в среднем в 1,5 раза ($p < 0,05$) аналогичный показатель в группе EVGFP28.

Обсуждение

Доклинический этап оценки живых противочумных вакцин должен не только продемонстрировать, что вакцина является иммуногенной и обладает протективной эффективностью, но также обосновать безопасность препарата, связанную в первую очередь, со степенью остаточной вирулентности (безвредности) вакцинного штамма чумного микроба, характеризующей его способностью к распространению и длительной персистенции в органах биомоделей.

Приживаемость клеток биофлуоресцентного штамма изучали в органах морских свинок микроскопическим и проточно-цитометрическим методами в течение 14 сут, что соответствует допустимому периоду размножения клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, обуславливающему иммунологическую перестройку организма (нестерильная фаза иммунитета) [12].

Метод люминесцентной микроскопии — один из основных оптических методов флуоресцентной визуализации [22] — позволяет наглядно и эффективно оценивать этапность распространения вирулентных штаммов в органах и тканях белых мышей [4]. В наших исследованиях установленная визуализация EVGFP в мазках-отпечатках из места введения культуры во всех опытных группах в 1-е сутки иммунного ответа согласуется с результатами ранее проведённых количественных бактериологических исследований, при которых наибольшее количество клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обнаруживали в месте введения ($2,3 \times 10^7$ м.к./г) через 24 ч [12].

Отсутствие флуоресцентных микробных клеток на 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза связано, вероятно, с низкой концентрацией EVGFP в мазках-отпечатках ($< 10^5$ м.к./мл), лежащей за пределами нижнего порога чувствительности люминесцентной микроскопии, составляющего 10^5 м.к./мл [23].

Новые возможности открыло использование более чувствительной и производительной техно-

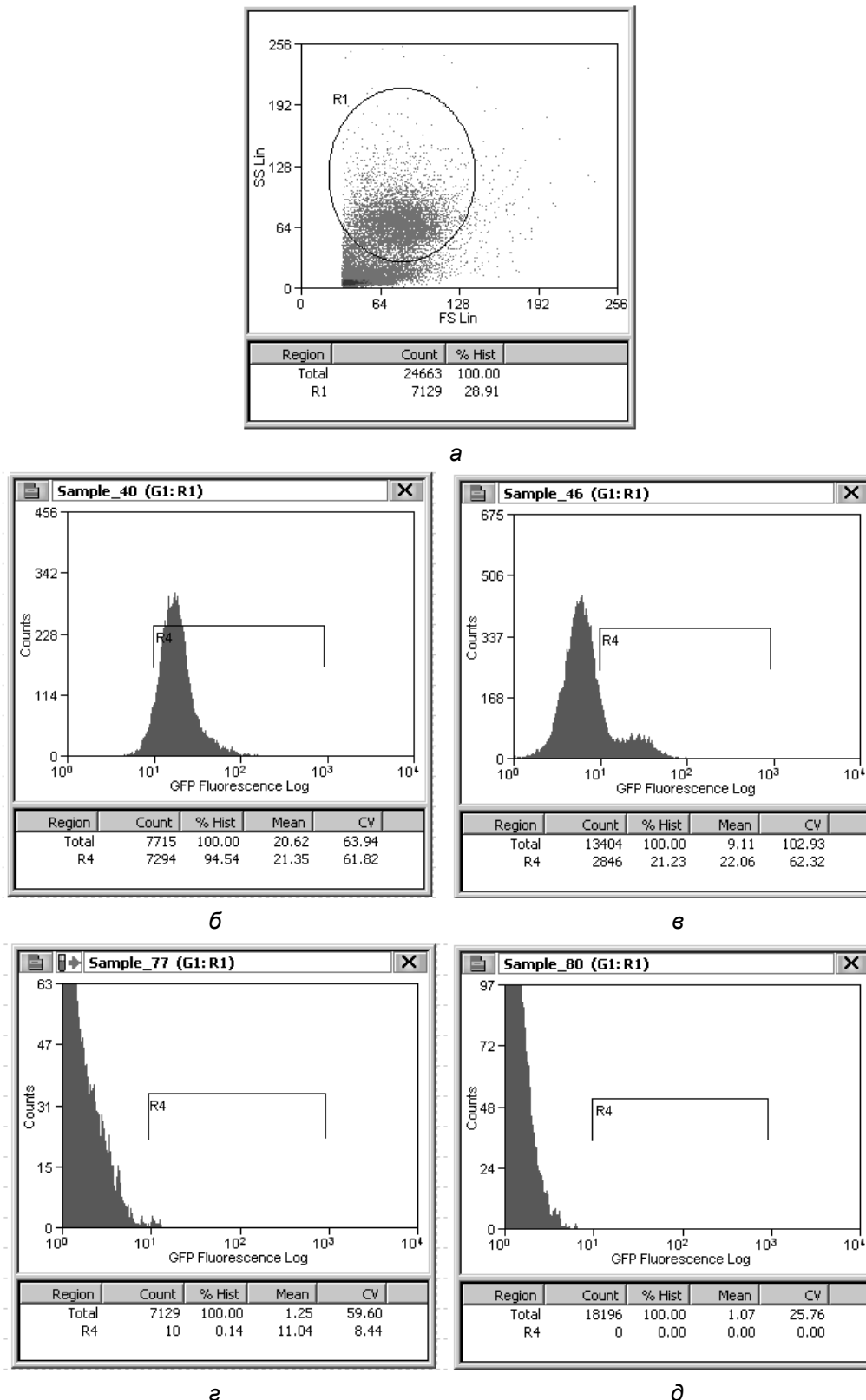


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции фагоцитов селезёнки морских свинок, иммунизированных биофлуоресцентным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (37°C) в динамике иммунного ответа.

а: область R1 соответствует общему количеству фагоцитов FS/SS dot plot образца клеток селезёнки морской свинки, привитой исходным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (контроль). Представлено характерное распределение отдельных фагоцитов селезёнки по размеру (FS) и по степени гранулярности (SS). Фагоциты селезёнки (28,91% клеток) локализуются в области R1 цитограммы.

Активные фагоциты локализуются на гистограммах в области R4: б–д: 1, 4, 7 и 14-е сутки соответственно после иммунизации морских свинок *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (37°C).

Детекция биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP в фагоцитах селезёнки морских свинок при иммунизации в сочетании с иммуномодуляторами по данным проточной цитометрии, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Группа	Схема иммунизации	Сутки	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число
1	EVGFP28	1	89,2 [83,0; 95,4]	19,3 [17,0; 21,5]
		4	19,8 [16,6; 22,0]	12,6 [11,8; 13,4]
		7	0,07 [0; 0,1]	1,6 [0,9; 2,3]
		14	0	0,7 [0,5; 0,8]
2	EVGFP28+АБ	1	99,1 [98,0; 99,4]	24,8 [20,7; 28,9]
		4	17,5 [15,4; 19,6]	19,2 [17,5; 20,9]*
		7	0,02 [0; 0,05]	10,0 [8,9; 11,2]*
		14	0	0
3	EVGFP28+ИЧР	1	97,4 [95,5; 99,4]	22,1 [18,0; 26,2]
		4	9,0 [8,4; 9,6]*	18,2 [15,7; 20,8]
		7	0,06 [0; 0,1]	8,7 [7,9; 9,5]*
		14	0	1,5 [1,3; 1,7]
4	EVGFP37	1	92,5 [87,8; 97,2]	19,6 [16,2; 23,0]
		4	21,2 [18,4; 24,0]	20,1 [15,4; 24,8]#
		7	0,1 [0,05; 0,20]	10,0 [8,3; 11,7]
		14	0,1 [0,05; 0,20]	1,0 [0,9; 1,1]
5	EVGFP37+АБ	1	98,5 [96,8; 99,2]	25,2 [20,0; 30,4]
		4	37,1 [37,0; 41,2]*#	17,5 [14,4; 20,6]
		7	0,2 [0,1; 0,3]	10,7 [8,1; 13,3]
		14	0	0,3 [0,1; 0,5]
6	EVGFP37+ИЧР	1	90,6 ± 5,2 [85,4; 95,8]	21,6 [17,1; 26,2]
		4	19,4 [17,6; 21,2]#	21,9 [18,0; 25,8]
		7	0,5 [0,2; 0,8]	10,5 [8,4; 12,6]
		14	0,2 [0,1; 0,3]	2,3 [1,9; 2,7]
7	Контроль (EV)		0	0

Примечание. * — значимые различия с группами 1 и 4 на соответствующие сутки ($p < 0,05$); # — значимые различия между группами 1 и 4, 2 и 5, 3 и 6 на соответствующие сутки ($p < 0,05$).

логии проточно-цитофлуориметрического анализа, позволяющей контролировать *in vivo* выживаемость бактерий в фагоцитах, а также отслеживать их распространение в организме хозяина в динамике [11, 24]. Фагоциты, содержащие флуоресцентные бактериальные клетки, регистрировались в течение 4 сут. Снижение числа флуоресцирующих фагоцитов (к 4-м суткам в среднем в 4,4 раза по сравнению с 1-ми сутками) могло быть связано как с внутриклеточным перевариванием поглощённых бактерий, так и со снижением поглотительной способности фагоцитов по отношению к чумным микробам, находящимся в активной стадии роста *in vivo* при температуре организма хозяина. Внутриклеточную локализацию EVGFP в макрофагах и нейтрофилах селезёнки подтверждали аналогичные результаты, полученные зарубежными учёными методом проточной цитометрии в опытах с другим флуоресцентным штаммом *Y. pestis* (pAGFP), экспрессирующим GFP [11]. Применявшаяся нами процедура пробоподготовки (Lyse/No-wash) без отмывки спленоци-

тов от лизирующего эритроциты и фиксирующего лейкоциты раствора «FACS Lysing Solution» фактически полностью исключала адгезию бактерий на клеточной поверхности, т. к. растворы, используемые для лизиса эритроцитов, удаляют бактерии, адсорбированные на поверхности фиксированных формальдегидом лейкоцитов [19].

Применение биофлуоресцентного штамма и проточной цитофлуориметрической технологии позволило зарегистрировать различный эффект используемых в работе иммуномодулирующих препаратов по влиянию на исход взаимодействия исследуемого штамма EVGFP с фагоцитами селезёнки морских свинок.

Полученные данные по сочетанному применению АБ с вакцинным штаммом, основанные на анализе фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов селезёнки морских свинок в нашем эксперименте, подтвердили ранее выявленный факт стимулирующего действия АБ на фагоцитарную активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/c

по отношению к *Y. pestis* EV НИИЭГ в тестах *in vitro* [15].

Согласно данным литературы об иммунологическом сходстве в паттернах генетической экспрессии IFN- γ и гомологии аминокислотной последовательности между морской свинкой и человеком [25, 26], ИЧР оказывал иное влияние на процесс фагоцитоза, снижая показатель ФИ и повышая показатель ФЧ (количество микробных клеток на один фагоцит) при 28°C. Объяснить это повышение может предположение о способности ИЧР ингибировать внутриклеточное переваривание бактерий в фагоцитах. Однако такому объяснению противоречит известная способность рекомбинантного IFN- γ активировать макрофаги и вызывать гибель внутриклеточных микроорганизмов [27]. Следовательно, этот факт объясняется влиянием ИЧР на свойства вакцинного штамма, приводящие к снижению его приживаемости в макроорганизме.

В опытах с использованием для вакцинации культур биофлуоресцентного штамма, выращенных в разных температурных режимах, подтверждён известный факт о более длительном выживании и переваривании клеток 37°C культуры *Y. pestis* в макрофагах [28, 29], связанный с индукцией экспрессии Саfl (F1) и других антифагоцитарных факторов, блокирующих фагоцитоз: белок наружной мембраны Ail, активатор плазминогена Pla, PsaA (pH6 антиген) [11, 30, 31].

Заключение

На примере применения биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EVGFP и метода проточной цитометрии показана возможность повышения эффективности оценки приживаемости в макроорганизме штаммов, а использование цитофлуориметрической технологии увеличивает её информативность и объективность, в том числе за счёт скорости выполнения такого анализа, позволяющего выполнять дополнительные исследования, раскрывающие механизмы взаимодействия микро- и макроорганизма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Chacón-Díaz C., Zabalza-Baranguá A., San Román B., et al. *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *PLoS One*. 2021;16(11):e0260288. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260288>
- Gensberger E.T., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*. 2017;132:21–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.008>
- Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г. и др. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(4):61–6. Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., et al. Construction of *Yersinia pestis* strain producing fluorescent protein GFP and prospects of its usage. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(4):61–6. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-61-66> EDN: <https://elibrary.ru/kprnki>
- Макашова М.А., Морозов О.А., Оглодин Е.Г. и др. Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Yersinia pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах. Патент РФ № 2769790С1;2022. Makashova M.A., Morozov O.A., Oglodin E.G., et al. Set of recombinant fluorescent strains of *Yersinia pestis* bacteria of main subspecies biovar and the Altai biovar of the central Asiatic subspecies for indication of plague agent in experimental samples. Patent RF № 2769790С1; 2022.
- Lemon A., Sagawa J., Gravelle K., Vadyvaloo V. Biovar-related differences apparent in the flea foregut colonization phenotype of distinct *Yersinia pestis* strains do not impact transmission efficiency. *Parasit. Vectors*. 2020;13(1):335. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04207-x>
- Bi Y., Du Z., Han Y., et al. *Yersinia pestis* and host macrophages: immunodeficiency of mouse macrophages induced by YscW. *Immunology*. 2009;128(1 Pt. 2):e406–17. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02990.x>
- Bi Y., Wang X., Han Y., et al. *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis*: effects on host macrophages. *Scand. J. Immunol.* 2012;76(6):541–51. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02767.x>
- Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages pathogens. *Pathogens*. 2020;9(8):611. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9080611>
- Su S., Bangar H., Saldanha R., et al. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiologyopen*. 2014;3(5):610–29. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.192>
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., et al. Enhancing the protective immune response to administration of a LIVP-GFP live attenuated Vaccinia virus to mice. *Pathogens*. 2021;10(3):377. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030377>
- Lukaszewski R.A., Kenny D.J., Taylor R., et al. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2005;73(11):7142–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.11.7142-7150.2005>
- Самойлова Л.В., Пионтковский С.А., Плотникова Е.А. и др. Особенности размножаемости вирулентного и вакцинного штаммов чумного микроба в организме морских свинок. В кн.: Горькова А.В., ред. *Профилактика особо опасных инфекций*. Саратов;1988:3–13. Samoilova L.V., Piontkovskii S.A., Plotnikova E.A., et al. Peculiarities of multiplication of virulent and vaccine strains of the plague microbe in the body of guinea pigs. In: Gor'kova A.V., ed. *Prevention of Especially Dangerous Infections*. Saratov;1988:3–13.
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф., Исследование температурозависимых молекулярных механизмов развития инфекций — ключ к созданию современных профилактических средств (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2016;8(3):137–50. Andryukov B.G., Somova L.A., Timchenko N.F. The study of temperature-dependent molecular mechanisms of infection development as a key to the development of modern prophylactic drugs (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(3):137–50. DOI: <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.16> EDN: <https://elibrary.ru/xqnhmn>
- Кравцов А.Л., Курылина А.Ф., Клочев С.Н., Щуковская Т.Н. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочум-

- ного иммунитета. *Иммунология*. 2016;37(6):320–5. Kravtsov A.L., Curylina A.F., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. The modulating effect of polyoxidonium on the reactivity of immune cells in the formation of anti-plague immunity. *Immunology*. 2016;37(6):320–5. DOI: <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-320-325> EDN: <https://elibrary.ru/xipgkh>
15. Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. и др. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(4):1412–20. Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.N., et al. Blood leukocyte phagocytic and cytokine-producing activity of anti-plague vaccinated BALB/c line mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium. *Russian Journal of Immunology*. 2019;13(4):1412–20. EDN: <https://elibrary.ru/aqjuec>
16. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):71–7. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):71–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77> EDN: <https://elibrary.ru/fbjedk>
17. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990;87(1):133–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90505-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90505-1)
18. Spinner J.L., Winfree S., Starr T., et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2014;95(3):389–98. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1112551>
19. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А. и др. Влияние противочумной вакцинации на фагоцитарную активность гранулоцитов крови человека. *Российский иммунологический журнал*. 2021;24(1):113–22. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., et al. Effect of antiplague vaccination on phagocytic activity of human blood granulocytes. *Russian Journal of Immunology*. 2021;24(1):113–22. DOI: <https://doi.org/10.46235/1028-7221-166-EOA> EDN: <https://elibrary.ru/aibbvs>
20. Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Определение фагоцитарного числа лейкоцитов периферической крови по отношению к *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии. *Иммунология*. 2007;28(4):236–40. Oliferuk N.S., Pinegin B.V. The phagocytic number definition of peripheral blood leukocytes in the ratio *Staphylococcus aureus* with flowing cytofluorimetry. *Immunology*. 2007;28(4):236–40. EDN: <https://elibrary.ru/iatzdj>
21. White-Owen C., Alexander J.W., Sramkoski R.M., Babcock G.F. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(8):2071–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.2071-2076.1992>
22. Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Вишняков И.Е. Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. *Цитология*. 2019;61(5):343–56. Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. Super-resolution microscopy methods and their use for visualization of various cell structures. *Cytology*. 2019;61(5):343–56. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0041377119050067> EDN: <https://elibrary.ru/unjbeu>
23. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.;2013. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practical Guide*. Moscow;2013.
24. Tartaro K., VanVolkenburg M., Wilkie D., et al. Development of a fluorescence-based in vivo phagocytosis assay to measure mononuclear phagocyte system function in the rat. *J. Immunotoxicol.* 2015;12(3):239–46. DOI: <https://doi.org/10.3109/1547691x.2014.934976>
25. Yamada H., Udagawa T., Mizuno S., et al. Newly designed primer sets available for evaluating various cytokines and iNOS mRNA expression in guinea pig lung tissues by RT-PCR. *Exp. Anim.* 2005;54(2):163–72. DOI: <https://doi.org/10.1538/expanim.54.163>
26. Jeevan A., Yoshimura T., Lee K.E., McMurray D.N. Differential expression of gamma interferon mRNA induced by attenuated and virulent *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pig cells after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect. Immun.* 2003;71(1):354–64. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.71.1.354-364.2003>
27. Сологуб Т.В., Цветков В.В., Деева Э.Г. Интерферон гамма-цитокин с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2014;22(3):56–60. Sologub T.V., Tsvetkov V.V., Deeva E.G. Interferon gamma-cytokine with antiviral, immunomodulatory and antitumor action. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2014;22(3):56–60. DOI: <https://doi.org/10.17816/pavlovj2014356-60> EDN: <https://elibrary.ru/szvbxl>
28. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002;70(3):1453–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.70.3.1453-1460.2002>
29. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013;3:106. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00106>
30. Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):33–40. Podladchikova O.N. Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):33–40. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-33-40> EDN: <https://elibrary.ru/zhgvr>
31. Peters D.T., Reifs A., Alonso-Caballero A., et al. Unraveling the molecular determinants of the anti-phagocytic protein cloak of plague bacteria. *PLoS Pathog.* 2022;18(3):e1010447. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010447>

Информация об авторах

Ключева Светлана Николаевна[✉] — канд. биол. наук, н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>.

Буданова Ангелина Андреевна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5092-432X>

Information about the authors

Svetlana N. Klyueva[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Angelina A. Budanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5092-432X>

Кравцов Александр Леонидович — д-р биол. наук, в. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>.

Бугоркова Светлана Александровна — д-р мед. наук, г. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>.

Участие авторов: *Клюева С.Н.* — методология и дизайн исследования, проведение экспериментов, микроскопические исследования, статистический анализ, написание рукописи; *Буданова А.А.* — конструирование рекомбинантного биофлуоресцентного штамма, микроскопические исследования; *Кравцов А.Л.* — методология и дизайн исследования, проведение экспериментов, научное редактирование рукописи; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, научное редактирование рукописи, руководство. 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 27.02.2025;
принята к публикации 21.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Author contribution: *Klyueva S.N.* — study methodology and design, experiments, microscopic studies, statistical analysis, manuscript writing; *Budanova A.A.* — construction of recombinant biofluorescent strain, microscopic studies; *Kravtsov A.L.* — study methodology and design, experiments, manuscript editing; *Bugorkova S.A.* — study concept and design, manuscript editing, management. 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 27.02.2025;
accepted for publication 21.04.2025;
published 28.04.2025



Опыт применения метода метагеномного секвенирования по фрагментам гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций

Васильева О.В.¹, Ульшина Д.В.^{1*}, Волынкина А.С.¹, Писаренко С.В.¹,
Сирица Ю.В.¹, Гнусарева О.А.¹, Яценко Н.А.², Куличенко А.Н.¹

¹Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

²Краевая специализированная клиническая инфекционная больница, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Метагеномное секвенирование — один из наиболее перспективных методов как для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций (ПОИ), так и для определения видовой структуры различных бактериальных сообществ.

Цель работы — выполнить детекцию и идентификацию возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала методом метагеномного секвенирования фрагментов гена *16S rPHK*, проанализировать таксономический состав эндосимбиотических микроорганизмов в образцах.

Материалы и методы. Исследованы образцы полевого (14 проб) и клинического (2 пробы) материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ, определённой методом полимеразной цепной реакции (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*). Амплификацию фрагментов гена, кодирующего *16S rPHK*, осуществляли с помощью праймеров, фланкирующих переменные участки гена.

Результаты. В 14 из 16 исследуемых образцов детектированы целевые возбудители ПОИ. До вида идентифицированы *R. aeschlimannii* (в 57,1% положительных образцов), *B. valaisiana* (в 16,6%), *F. tularensis* (в 75%), *C. burnetii* (в 100%), также в одном образце выявлены боррелии — возбудители возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica*). Исследована таксономическая структура микробиома клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Dermaceptor marginatus*, собранных в южных регионах России. Выявлено, что преобладающие микроорганизмы — это представители родов *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. В пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей *Candidatus Midichloria mitochondrii*, представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, непатогенных и условно-патогенных для человека видов родов *Francisella*.

Заключение. Показана эффективность метода метагеномного секвенирования фрагментов гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей ПОИ в пробах клинического и полевого материала. Метагеномное секвенирование по участкам гена *16S rPHK* может быть рекомендовано в качестве дополнительного метода лабораторного исследования образцов с целью детекции и идентификации возбудителей ПОИ.

Ключевые слова: метагеномное секвенирование, *16S rPHK*, природно-очаговые инфекции, детекция, идентификация, микробиом

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. 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 локальным этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (заключение № 112 19.05.2023).

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: Васильева О.В., Ульшина Д.В., Волынкина А.С., Писаренко С.В., Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Яценко Н.А., Куличенко А.Н. Опыт применения метода метагеномного секвенирования по фрагментам гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):201–212.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

Experience of applying the metagenomic sequencing method on fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of natural focal infection pathogens

Oksana V. Vasilieva¹, Diana V. Ul'shina¹✉, Anna S. Volynkina¹, Sergey V. Pisarenko¹, Yulia V. Siritsa¹, Olga A. Gnusareva¹, Natalia A. Yatsenko², Alexandr N. Kulichenko¹

¹Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

²Regional Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. Metagenomic sequencing is one of the most promising methods for both the detection and identification of natural focal infection (NFI) pathogens and for determining the species composition of various bacterial communities.

The aim is to detect and identify the NFI pathogens in samples of field and clinical material using metagenomic sequencing of 16S rRNA gene fragments, and to analyze the taxonomic composition of endosymbiotic microorganisms in the samples.

Materials and methods. Samples of field (14 samples) and clinical (2 samples) material with varying loads of DNA from NFI pathogens, determined by PCR (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*), were investigated. Amplification of fragments of the gene encoding 16S rRNA was performed using primers flanking the variable regions of the gene.

Results. In 14 out of 16 studied samples, target NFI pathogens were detected. The species identified included *R. aeschlimannii* (in 57.1% of positive samples), *B. valaisiana* (in 16.6%), *F. tularensis* (in 75%), *C. burnetii* (in 100%), and borreliae — pathogens of relapsing fevers (*B. turcica*, *B. hispanica*) were also found in one sample. The taxonomic structure of the microbiome of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Dermacentor marginatus* ticks collected in the southern regions of the Russian Federation was studied. It was shown that the predominant microorganisms are representatives of the genera *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. DNA markers of microorganisms — endosymbionts of ticks *Candidatus Midichloria mitochondrii*, representatives of the genera *Rickettsiella*, *Coxiella*, non-pathogenic and conditionally pathogenic species of the genus *Francisella* were found in pools of *Ixodes* ticks.

Conclusion. The effectiveness of the method of metagenomic sequencing of fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of NFI pathogens in samples of clinical and field material was demonstrated. Metagenomic sequencing of 16S rRNA gene regions can be recommended as an additional laboratory method for detecting and identifying NFI pathogens.

Keywords: metagenomic sequencing, 16S rRNA, natural focal infections, detection, identification, microbiome.

Ethical approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. 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 study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Stavropol State Medical University (protocol No. 112, May 5, 2023).

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: Vasilieva O.V., Ul'shina D.V., Volynkina A.S., Pisarenko S.V., Siritsa Yu.V., Gnusareva O.A., Yatsenko N.A., Kulichenko A.N. Experience of applying the metagenomic sequencing method on fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of natural focal infection pathogens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):201–212.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

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

Введение

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) широко распространены в мире и представляют важную медико-социальную проблему, значение которой в последние годы неуклонно возрастает по мере выявления новых патогенов, источниками и пере-

носчиками которых являются кровососущие членистоногие, мелкие млекопитающие и птицы [1–3]. Сохранение активности и расширение территорий природных очагов, а также высокая антропогенная нагрузка на окружающую среду приводят к постоянному росту числа людей, контактирующих с возбу-

телями ПОИ и подвергающихся риску заражения [4]. Доказано, что одновременное инфицирование носителей и переносчиков различными возбудителями ПОИ — естественное и широко распространённое явление, обуславливающее, в свою очередь, возможность сочетанной патологии у человека [5–7].

В настоящее время для лабораторной диагностики ПОИ широко применяются молекулярно-генетические методы исследования, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая в короткие сроки выявить присутствие ДНК/РНК возбудителей ПОИ в материале. Большинство разработанных ПЦР-тест-систем для выявления возбудителей ПОИ предназначены для детекции одного или нескольких патогенов [8]. Для обнаружения всех потенциальных возбудителей ПОИ необходимо применение комплекса тест-систем, что длительно и трудоёмко.

К современным подходам, позволяющим выполнять одновременно детекцию и идентификацию всех микроорганизмов — как известных, так и новых, содержащихся в образце, и не требующим проведения культивирования, относятся методы метагеномного секвенирования (metagenomics sequencing, MGS) [9]. Применение методов MGS для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе ПОИ, представляется особенно востребованным в случаях, когда традиционные лабораторные тесты не позволяют идентифицировать этиологический агент при атипичном течении заболевания, а также при микст-инфицировании различными возбудителями [10–12]. Кроме того, MGS образцов полевого материала (эктопаразитов, органов мелких млекопитающих, птиц и др.), собранных при эпизоотологическом обследовании территории, может быть полезно для получения новых комплексных данных о видовом составе патогенных и эндосимбиотических микроорганизмов, ассоциированных с различными видами носителей и переносчиков инфекций [13].

Существует несколько вариантов проведения MGS: таргетное секвенирование целевых участков генома, кодирующих эволюционно консервативные гены (*16S pPHK* и др.), и полногеномное MGS. Широкое распространение для анализа таксономического состава бактерий в образцах, а также обнаружения патогенных видов бактерий получил подход, основанный на таргетном секвенировании переменных участков гена *16S pPHK*. К преимуществам этого метода можно отнести возможность проведения таксономической классификации широкого круга бактерий, наличие этапа предварительного специфического обогащения целевого участка генома бактерий перед проведением секвенирования, относительную простоту биоинформационного анализа результатов по сравнению с методом секвенирования полного метагенома [14, 15].

Цель работы — выполнить детекцию и идентификацию возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала методом MGS фрагментов гена *16S pPHK*, проанализировать таксономический состав эндосимбиотических микроорганизмов в образцах.

Материалы и методы

Исследованы 16 образцов полевого (отобранного в ходе эпизоотологического обследования) и клинического материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ бактериальной этиологии, определённой методом ПЦР (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*). Образцы содержали генетический материал одного и нескольких возбудителей ПОИ (табл. 1).

Работу с клиническим материалом осуществляли при добровольном информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Материал от животных, использованный в работе, был получен согласно Плану проведения эпизоотологического обследования территории Ставропольского края по ПОИ и особо опасным инфекциям на 2024 г. (согласован Руководителем управления Роспотребнадзора по СК от 21.12.2023, утверждён Главным врачом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в СК» от 21.12.2023). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (заключение № 112 от 19.05.2023).

Сбор иксодовых клещей проводили с апреля по июнь с животных и растительности («на флаги»), видовую идентификацию клещей осуществляли морфологическим методом [16]. Из клещей составляли пулы по 10 экземпляров в каждом согласно Методическим рекомендациям 3.1.0322-23¹. Пробоподготовку клинического и полевого материала выполняли в соответствии с Методическими указаниями 1.3.2569-09².

Клещей обрабатывали 70% этанолом, промывали в фосфатно-солевом буфере. Параметры гомогенизации для полученных образцов выбирали, исходя из родовой принадлежности клещей. Полу-

¹ Методические рекомендации МР 3.1.0322-23 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах инфекционных болезней» (утв. Руководителем Роспотребнадзора 13.04.2023).

² Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (утв. Руководителем Роспотребнадзора 22.12.2009).

Таблица 1. Данные об образцах, использованных для анализа методом MGS

№	Вид материала	Данные об образце, место выделения	Возбудитель, подтверждённый методом ПЦР	Ct
1		<i>Ixodes ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,8
2		<i>I. ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	22,1
3		<i>I. ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,1
4	Суспензии клещей	<i>I. ricinus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>A. phagocytophilum</i>	31,4
5		<i>I. ricinus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>A. phagocytophilum</i>	23,4
6		<i>Dermacentor marginatus</i> , с растительности, Ставропольский край	<i>Rickettsia</i> spp.	17,2
7		<i>Rhipicephalus annulatus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>Rickettsia</i> spp.	23,3
8		<i>D. marginatus</i> , с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i>	26,6
9	Смыв с грудной полости	<i>Microtus arvalis</i> , Ставропольский край	<i>F. tularensis</i>	10,1
10		Средиземноморская черепаха <i>Hyalomma aegyptium</i> , Республика Дагестан	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Rickettsia</i> spp.	20,2 16,3
11		<i>I. ricinus</i> с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Rickettsia</i> spp.	25,4 17,0
12	Суспензии клещей	<i>I. ricinus</i> с растительности, Краснодарский край	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,7
			<i>Rickettsia</i> spp.	18,8
13		<i>Dermacentor reticulatus</i> с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i> <i>Rickettsia</i> spp.	25,5 17,2
14		<i>D. reticulatus</i> с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i> <i>Rickettsia</i> spp.	12,6 21,1
15	Сыворотка крови	Человек, Ставропольский край	<i>C. burnetii</i>	21,4
16	Сыворотка крови	Человек, Ставропольский край	<i>C. burnetii</i>	21,3

ченную суспензию центрифугировали в 300 мкл стерильного физиологического раствора.

Экстракцию нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови человека, гомогенатов пулов клещей и смыва с грудной полости полёвки обыкновенной проводили с помощью набора реагентов «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис»).

Наличие ДНК возбудителей ПОИ в образцах определяли методом ПЦР с использованием наборов реагентов: «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», «АмплиСенс *TBEV*, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «Ген *Francisella tularensis*-РГФ» (Российский противочумный институт «Микроб»). ДНК риккетсий в образцах полевого материала выявляли по протоколу, описанному О. Mediannikov и соавт. [17].

Амплификацию фрагментов гена *16S pPHK* микроорганизмов, содержащихся в образцах, для проведения MGS осуществляли с использованием праймеров, описанных I. Abellan-Schneyder и соавт. [18] (табл. 2). Для амплификации каждого варибельного фрагмента гена *16S pPHK* (V1–V2, V1–V3, V3–V4, V4, V4–V5, V6–V8, V7–V9) готовили отдельную реакционную смесь. Состав реакционной смеси: праймер F (C = 7,2 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, праймер R

(C = 7,2 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, ПЦР-смесь «Био-Мастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» («Биолабмикс») — 12,5 мкл, ДНК образца — 10 мкл. Амплификацию продуктов ПЦР осуществляли по программе термоденатурации: 95°C — 5 мин; 95–20 с, Ta — 30 с, 72°C — 40 с (40 циклов); 72°C — 5 мин; 4 — ∞.

Оценку размера и чистоты полученных продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле. Процедуру очистки продуктов ПЦР от избытка праймеров и компонентов реакционной смеси выполняли с использованием набора «CleanMag DNA» («Евроген»). Для подготовки библиотек брали эквивалентные количества продуктов амплификации фрагментов гена *16S pPHK* V1–V9. Измерение итоговой концентрации целевой ДНК проводили на флуориметре «Qubit» с помощью набора «Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS)» («Invitrogen»).

Библиотеки фрагментов ДНК готовили по протоколу Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора «Ion Plus Fragment Library Kit» («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Секвенирование библиотек, приготовленных из смесей ампликонов, выполняли на платформе GeneStudio S5 Plus («Thermo Fisher Scientific Inc.»).

Таблица 2. Последовательности праймеров для амплификации фрагментов гена, кодирующего *16S pPHK*

№	Маркировка фрагмента	Длина фрагмента, п. н.	Температура отжига, °С	Праймер	Последовательность 5'–3'
1	V1–V2	311	57	27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG
				338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
2	V1–V3	507	57	27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG
				534R	ATTACCGCGGCTGCTGG
3	V3–V4	404	54	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
				785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
4	V4	293	54	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
				806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
5	V4–V5	429	54	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
				944R	GAATTAACACATGCTC
6	V6–V8	439	57	939F	GAATTGACGGGGGCCCGACAAG
				1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG
7	V7–V9	377	51	1115F	CAACGAGCGCAACCTT
				1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT

Для биоинформатического анализа данных MGS по участкам гена *16S pPHK* использовали программы Fastp Qc³, Kallisto⁴, STAR [19], Bowtie2⁵. Качество fastq-файлов оценивали с использованием программ Fastp Qc и Kallisto, прочтения со значением показателя качества Q < 20 были исключены из анализа. Выравнивание и фильтрацию последовательностей проводили с помощью программного обеспечения STAR и Bowtie2.

Сборку коротких прочтённых последовательностей *de novo* в более длинные последовательности (контиги) проводили с помощью ассемблера SPAdes. Таксономическую принадлежность геномных последовательностей определяли в результате их сравнения с базой данных NCBI (RefSeq и GenBank с помощью Rapsearch2⁶).

Результаты видовой идентификации микроорганизмов (боррелий, риккетсий), полученные при проведении MGS по участкам гена *16S pPHK*, подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты

Выполнено MGS по участкам гена *16S pPHK* 16 образцов клинического и полевого материала, содержащих ДНК возбудителей ПОИ бактериальной природы (табл. 3). Нуклеотидные последовательности, полученные с помощью MGS, депонировали в базу данных GenBank (BioProject PRJNA1227530; SAMN46987881–SAMN46987896).

Количество прочтений, удовлетворяющих параметру Q20, для исследуемых образцов составило 1127–40 969. Величина GC для всех образцов варьировала в диапазоне 49,7–52,4%, что соответствует экзомным участкам фрагментов гена *16S pPHK*, используемого для анализа методом MGS. В ходе обработки полученных данных установили, что наибольшее количество ридов после фильтрации получено для образца № 13 (93 789 000 К). Для образцов № 9, 14 наблюдалось сокращение количества чтений (29 314 000 К и 28 704 000 К). Общее количество ридов после этапа фильтрации для 4 образцов (№ 2, 5, 7, 10) варьировало в интервале 9 172 000–16 651 000 К. Количество отфильтрованных данных для остальных образцов находилось в диапазоне 488–7 633 000 К. Наименьшее количество отфильтрованных данных (Q < 20) после биоинформационной обработки было отмечено для образцов № 4, 8 и 11. Наибольшее количество данных неудовлетворительного качества (Q < 20) было получено для образцов № 9, 13 и 14. Результат оценки качества данных представлен на рис. 1.

Возбудители ПОИ, выявленные методом MGS по варибельным областям гена *16S pPHK*

При исследовании образцов суспензий иксодовых клещей (№ 1–8, табл. 3) с подтверждённым по результатам исследования методом ПЦР моноинфицированием боррелиями генокомплекса *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, риккетсиями и *F. tularensis* методом MGS гена *16S pPHK* детектированы представители родов *Borrelia* (образцы № 1–3), *Francisella* (образец № 8) (микроорганизмы идентифицированы до рода), а также *R. aeschlimannii* (образцы № 6, 7, микроорганизм

³ URL: <https://github.com/OpenGene/fastp>

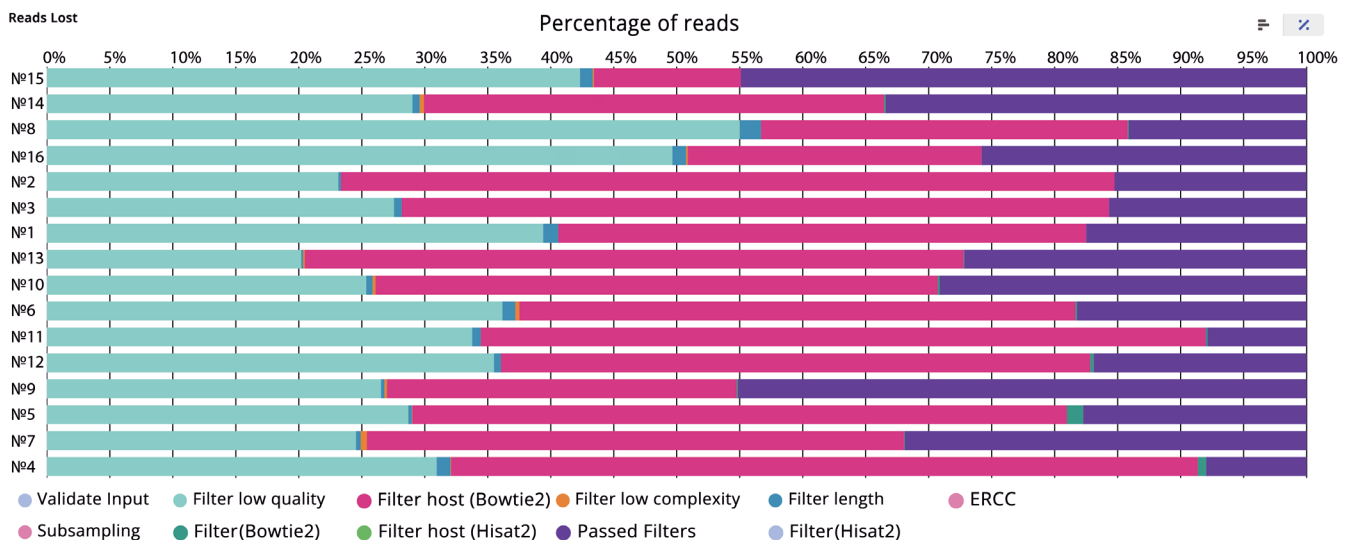
⁴ URL: <https://github.com/Roslin-Aquaculture/RNA-Seq-kallisto>

⁵ URL: <https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>

⁶ URL: <https://github.com/zhaoyanswill/RAPSearch2>

Таблица 3. Сопоставление результатов, полученных с помощью методов ПЦР и MGS фрагментов гена *16S rPHK*

№ образца	Метод ПЦР		Метод MGS фрагментов гена <i>16S rPHK</i>	
	выявленные патогены	Ct	Q20, % (количество прочтений)	выявленные патогены (количество ридов, соответствующих целевому патогену, %)
Моно-инфицированные образцы				
1	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,80	91,50 (5822)	<i>Borrelia</i> spp. (2,90)
2	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	22,10	91,90 (20 236)	<i>Borrelia</i> spp. (3,10)
3	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,10	92,20 (10 627)	<i>Borrelia</i> spp. (3,20)
4	<i>A. phagocytophilum</i>	31,40	87,50 (12 922)	Не обнаружено
5	<i>A. phagocytophilum</i>	23,40	91,80 (6618)	Не обнаружено
6	<i>Rickettsia</i> spp.	17,20	91,60 (8239)	<i>R. aeschlimannii</i> (8,90)
7	<i>Rickettsia</i> spp.	23,30	92,10 (22 324)	<i>R. aeschlimannii</i> (0,80)
8	<i>F. tularensis</i>	26,60	91,00 (1127)	<i>Francisella</i> spp. (2,60)
9	<i>F. tularensis</i>	10,10	91,60 (40 161)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
Микст-инфицированные образцы				
10	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	20,20	90,60 (163 336)	<i>B. turcica</i> (27,00)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>B. hispanica</i> (7,60)
11	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,40	91,90 (11 506)	<i>R. aeschlimannii</i> (9,50)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>Borrelia</i> spp. (2,40)
12	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,70	92,40 (5952)	<i>Rickettsia</i> spp. (2,60)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>B. valaisiana</i> (7,60)
13	<i>F. tularensis</i>	25,50	91,00 (11 506)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>R. aeschlimannii</i> (11,30)
14	<i>F. tularensis</i>	12,60	91,70 (40 696)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>Rickettsia</i> spp. (4,10)
Клинический материал				
15	<i>C. burnetii</i>	21,40	90,60 (8926)	<i>C. burnetii</i> (5,30)
16	<i>C. burnetii</i>	21,30	90,00 (7223)	<i>C. burnetii</i> (5,00)

**Рис. 1.** Гистограмма, отражающая результат оценки качества данных MGS по участкам гена *16S rPHK*.

Цвет секторов на гистограмме отражает количество ридов для каждого образца, прошедших фильтрацию по качеству (в %, вверху). Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

идентифицирован до вида). Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека методом MGS обнаружить не удалось (образцы № 4, 5). Результаты видовой идентификации *R. aeschlimannii* в образцах № 6, 7 подтверждены методом секвенирования фрагмента генома по Сэнгеру.

Исследованы микст-инфицированные образцы иксодовых клещей (образцы № 10–14, табл. 3) с комбинацией двух возбудителей клещевых инфекций (*B. burgdorferi* s.l и *Rickettsia* spp.; *F. tularensis* и *Rickettsia* spp.). Методом MGS в образцах были детектированы все целевые микроорганизмы. До вида идентифицированы *R. aeschlimannii* (образцы № 10, 13), *B. valaisiana* (образец № 12), *F. tularensis* (образцы № 13, 14), также в образцах выявлены микроорганизмы родов *Rickettsia* (образцы № 11, 12, 14) и *Borrelia* (образцы № 11, 12, 14), вид которых идентифицировать не удалось. В образце № 10 методом MGS детектировали генетические маркеры (ДНК): боррелий, возбудителей возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica*). Подтвердить результаты видовой идентификации боррелий, содержащихся в образце № 10, с помощью секвенирования нуклеиновых кислот по Сэнгеру не удалось, что обусловлено микст-инфицированием образца суспензии клещей *H. aegyptium*. Результаты видовой идентификации остальных микроорганизмов, выявленных в образцах, подтверждены секвенированием фрагментов генома возбудителей.

Методом MGS в 3 образцах, содержащих ДНК возбудителя туляремии (Ct 10,1; 12,6; 25,5), *F. tularensis* идентифицирована до вида, в 1 образце (Ct 26,6) установлено наличие микроорганизмов рода *Francisella* spp., видовую идентификацию выполнить не удалось.

C. burnetii по результатам MGS по участку гена *16S pPHK* идентифицирована в 2 заведомо положительных пробах плазмы крови от больных лихорадкой Ку (значения Ct 21,3–21,4). В образцах клинического материала № 15, 16 от больных лихорадкой Ку методом MGS выявили наличие ДНК *C. burnetii*, доля целевых прочтений составила 5,0–5,3%. Кроме того, в клинических образцах обнаружены нуклеотидные последовательности бактерий *Methylophilus medardicus*, а также представителей родов *Acinetobacter* и *Shingomonas*, что может свидетельствовать о возможной контаминации образцов на этапах отбора, хранения и лабораторного исследования [20].

Проведено сравнение результатов исследования образцов полевого и клинического материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ, полученных методами MGS по участкам гена *16S pPHK* и ПЦР. Показано, что в результате MGS 6 образцов, положительных на наличие ДНК боррелий генокомплекса *B. burgdorferi* s.l., в 4 образцах проведена идентификация боррелий до рода (*Borrelia* spp.

Ct 21,8; 22,1; 21,1; 25,4), в 2 — до вида (*B. valaisiana* Ct 25,7, *B. turcica*, *B. hispanica* Ct 20,2).

По результатам MGS фрагменты генома *Rickettsia* spp. выявлены во всех заведомо положительных пробах, в 4 образцах (значения Ct 16,2; 17,2; 17,2 и 23,3) идентифицирован вид риккетсий (*R. aeschlimannii*), в 3 образцах (значения Ct 17,0; 18,8 и 21,1) видовую идентификацию риккетсий выполнить не удалось. Представленные результаты идентификации боррелий и риккетсий в исследованном материале (табл. 3) подтверждаются данными литературы о сложности определения видовой принадлежности методом MGS представителей рода *Rickettsia* и *Borrelia* [8, 15]. Осуществление точной видовой идентификации риккетсий и боррелий с помощью MGS затруднено из-за высокой гомологии нуклеотидных последовательностей гена *16S pPHK* для указанных бактериальных патогенов [12, 13]. В случае детекции микроорганизмов родов *Rickettsia* и *Borrelia* методом MGS гена *16S pPHK* может понадобиться дальнейшая их идентификация до вида с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Единственный патоген, наличие которого не удалось подтвердить в результате MGS, — *A. phagocytophilum*.

Таксономический состав микробиома иксодовых клещей

Исследование таксономической структуры микробиома клещей проводили в соответствии с их видовой принадлежностью, местом и территорией сбора (рис. 2).

Основные таксономические группы микробиома клещей:

- для представителей *I. ricinus* (образцы № 1–3): *Flavobacterium* spp. (57–81%), *Pseudomonas* spp. (7–27%), *Serratia* spp. (2–4%), *Pedobacter* spp. (2–4%);
- для представителей *I. ricinus* (образцы № 4, 5): *Candidatus Midichloria mitochondrii* (31–87%), *Clostridium* spp. (6–61%), *Sphingomonas* spp. (3%), *Staphylococcus* spp. (1–10%), *Bradyrhizobium* spp. (1%);
- для представителей *I. ricinus* (образцы № 11, 12): *Pseudomonas* spp. (7–49%), *Serratia* spp. (4–12%), *Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator* (3–19%), *Rhodobacterales* spp. (3%);
- для представителей *D. reticulatus* (образцы № 13, 14): *Flavobacterium* sp. Nj (25–53%), *Cardinium endosymbiont of Bemisia tabaci* (19%), *Clostridium* spp. (15%), *Francisella-like endosymbiont of Dermacentor reticulatus* (9–21%), *Francisella persica* (2%), uncultured *Francisella* spp. (1–6%), *Bradyrhizobium* spp. (1–3%), *Dyadobacter* spp. (1–3%);

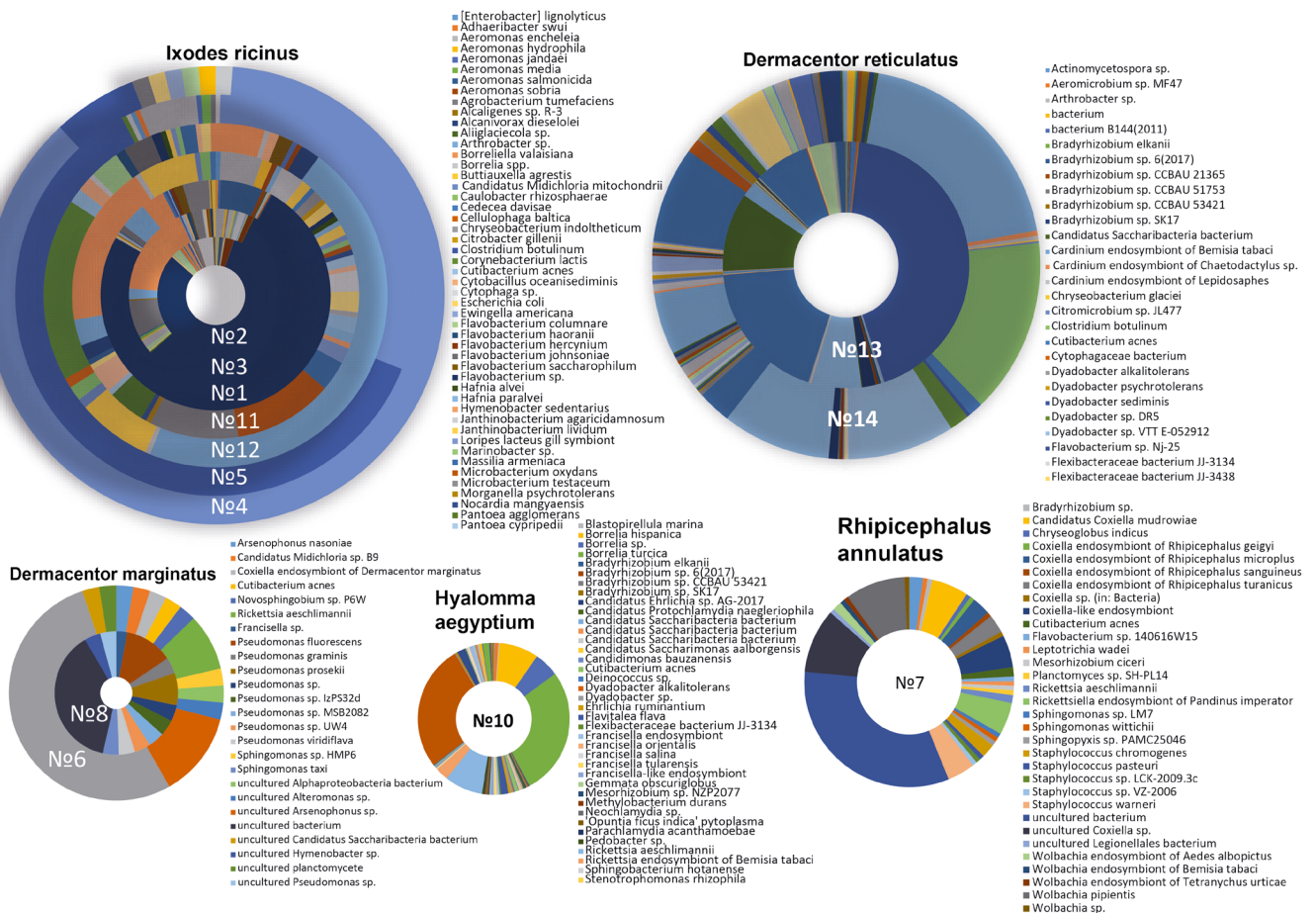


Рис. 2. Таксономический состав микробиомов иксодовых клещей (номера образцов указаны цифрами).

В связи с наличием большого количества данных, цветовыми маркерами отмечены только наиболее представленные таксоны. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

- для представителей *R. annulatus* (образец № 7): *Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator* (5%), uncultured *Coxiella* spp. (10%), *Wolbachia pipientis* (9%), *Candidatus Coxiella mudrowiae* (6%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus microplus* (3%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus geigy* (1%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus turanicus* (3%), *Shingomonas* spp. (5%), *Staphylococcus* spp. (5%), *Bradyrhizobium* spp. (3%), *Flavobacterium* spp. (2%), *Leptotrichia wadei* (2%);
- для представителей *H. aegyptium* (образец № 10): *Rickettsia endosymbiont of Bemisia tabaci* (3%), *Flavitalea flava* (1%), uncultured *Borrelia* spp. (9%), *Blastopirellula marina* (4%), *Dyadobacter alkalitolerans* (2%), *Bradyrhizobium* (1%);
- для представителей *D. marginatus* (образцы № 6, 8): *Pseudomonas* spp. (9–33%), uncultured *Arsenophonus* spp. (11%), uncultured *Alteromonas* spp. (2%), *Alphaproteobacteria bacterium* (2%), *Coxiella endosymbiont of Dermacentor marginatus* (2%).

Обсуждение

В работе применён метод MGS по участкам гена *16S pPHK* для детекции и идентификации известных возбудителей ПОИ бактериальной этиологии в образцах клинического и полевого материала, исследована возможность его использования при одновременном выявлении различных видов патогенных микроорганизмов. Определена микст-инфицированность двумя возбудителями ПОИ (боррелиоз, клещевой риккетсиоз, туляремия) нескольких пулов иксодовых клещей. Отрицательный результат при детекции *A. phagocytophilum* может быть обусловлен низкой концентрацией бактериального патогена в исследуемом материале, а также недостаточным качеством и количеством данных, полученных после биоинформационной обработки.

Результаты использования метода таргетного MGS по участкам гена *16S pPHK* для выявления возбудителей ПОИ в образцах клинического и полевого материала представлены в ряде публикаций. Так, L. Kingy и соавт. при MGS по участку гена *16S pPHK* в образцах клинического материала от лихорадящих больных, обнаружили возбудителей инфекций, переносимых клещами: *B. burgdorferi* s.l., *B. mayonii*,

B. miyamotoi, *B. hermsii*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. muris* subsp. *eaucularinsis*, *E. ewingii*, *F. tularensis* [8]. R. Takhampunya и соавт. при исследовании крови пациентов с лихорадкой неясного генеза выявили микроорганизмы родов *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Leptospira*, *Orientia* [15]. Кроме того, другими авторами получены результаты исследования с использованием метода *16S pPHK* MGS проб иксодовых клещей на весь спектр возбудителей клещевых инфекций [20–22].

Одна из востребованных областей применения метода MGS по участку гена *16S pPHK* — исследование клинических образцов от больных с лихорадками неясного генеза в случаях, когда традиционные методы исследования (ПЦР, иммуноферментный анализ, серологические методы и др.) не позволили идентифицировать возбудителя. Обнаружение в материале от лихорадящих больных микроорганизмов, принадлежащих к родам, включающим возбудители ПОИ, позволит в дальнейшем провести углублённый молекулярно-генетический анализ для подтверждения наличия ДНК выявленных патогенных микроорганизмов в образце.

В литературе имеются многочисленные сообщения о случаях заболеваний людей сочетанными формами ПОИ, вызванных ассоциациями микроорганизмов, клиническое течение которых по сравнению с моноинфекциями существенно тяжелее, а лабораторное подтверждение диагноза затруднено [23, 24]. При этиологической расшифровке подобных случаев метагеномный подход приобретает особую актуальность и наглядно демонстрирует своё преимущество.

В результате биоинформатической обработки данных MGS по варибельным фрагментам гена *16S pPHK* определён таксономический состав микробиома, ассоциированного с клещами *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *R. annulatus*, *H. aegyptium*, *D. marginatus*, собранных в южных регионах России (рис. 2). В составе микробиома всех клещей преобладали микроорганизмы: *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Pedobacter* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Shingomonas* spp. Возможно, часть этих бактерий попала в организм клещей в процессе их жизнедеятельности или населяет их хитиновый экзоскелет и пищеварительную систему, при этом не являясь симбионтами членистоногих [25].

Кроме того, в пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей, в том числе *Candidatus Midichloria mitochondrii* (образцы № 4, 5), представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, *Candidatus Coxiella mudrowiae* (образец № 7), непатогенных и условно-патогенных для человека видов *Francisella* spp. (*F. frigiditurris*, *F. philomiragia*, *F. persica*) (образец № 13).

Представляется интересным, что состав бактериального сообщества пула иксодовых клещей

образца № 10 на основе данных MGS участков гена *16S pPHK* существенно отличался от остальных образцов, что может быть связано с особенностями прокормителя клещей и видом переносчика клещевых инфекций — средиземноморской черепахи. В небольших количествах выявлены бактерии рода *Bradyrhizobium* — симбиотические микроорганизмы растений, *Blastopirellula marina* и *Dyadobacter alkalitolerans* — естественные обитатели солёных водоёмов и песчаных почв. Полученные результаты, представленные в табл. 3 и на рис. 2, согласуются с данными литературы о бактериальных патогенах, переносимых клещами *H. aegyptium* и встречающихся в крови пресмыкающихся (питоны, ящерицы и черепахи) [26, 27]. Опубликована информация о выявлении маркеров возбудителей ПОИ (боррелиоз, клещевой риккетсиоз) в ходе исследования биологического материала от рептилий и клещей, снятых с рептилий: *R. aeschlimannii* [28], *B. turcica* [29, 30], *B. hermsii* [31], *B. crociduræ* [32] и *B. hispanica* [33]. Указанные данные о высокой встречаемости боррелий — возбудителей возвратных лихорадок у животных подтверждают широкое распространение этих бактериальных патогенов в ряде регионов и имеют почти убиквитарный характер.

Использование MGS при исследовании иксодовых клещей, очевидно, может быть эффективно для получения комплексной информации о видовом спектре возбудителей ПОИ, а также эндосимбионтах, ассоциированных с различными видами иксодовых клещей, обитающих в разных регионах. Как следствие — открытие новых перспектив в изучении видового спектра возбудителей ПОИ, а также подборе микроорганизмов для оценки специфичности существующих и разрабатываемых ПЦР-тест-систем, предназначенных для исследования образцов полевого материала [34]. Полученная в данной работе информация о видах эндосимбиотических микроорганизмов, выявленных в пулах иксодовых клещей, согласуется с ранее опубликованными данными [34].

Необходимо учитывать ограничения метода при определении видовой принадлежности близкородственных микроорганизмов, в том числе для ряда видов боррелий, риккетсий на основании данных MGS [35, 36]. Показано, что результаты таксономической классификации могут отличаться в зависимости от используемых варибельных регионов [37–39]. В этом случае повышению дискриминирующей способности метода способствует использование смеси праймеров, нацеленных на различные гиперварибельные области гена *16S pPHK* [40–42], что и было применено в настоящем исследовании.

Заключение

Нами проведён анализ таксономического состава микроорганизмов, а также детекция и иден-

тификация возбудителей ПОИ в образцах методом MGS по участкам гена *16S rPHK*, экспериментально подтверждена эффективность применения данного метода для выявления возбудителей ПОИ в пробах клинического и полевого материала. Проведена детекция микроорганизмов, относящихся к родам *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Francisella* spp., содержащих в том числе патогенные для человека виды, а также видовая идентификация возбудителей ПОИ с различной нагрузкой ДНК в исследуемом материале, в частности, *R. aeschlimannii* (Ct при исследовании методом ПЦР до 23,3), *C. burnetii* (Ct < 21,4), *F. tularensis* (Ct < 26,6), боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. (*B. valaisiana*, Ct < 25,7), боррелий возбудителей возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica* Ct < 20,2). Исследована таксономическая структура микробиома клещей *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *R. annulatus*, *H. aegyptium*, *D. marginatus*, собранных в южных регионах России. Показано, что преобладают микроорганизмы — представители родов *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. В пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей *Candidatus Midichloria mitochondrii*, представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, непатогенных и условно-патогенных для человека видов рода *Francisella*.

Продолжение работы в данном направлении позволит более точно оценить разрешающую способность метода для детекции и идентификации возбудителей ПОИ. Изучение закономерностей существования возбудителей ПОИ в структуре микробиома клещей является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Основное преимущество метода MGS по участку гена *16S rPHK* при исследовании образцов полевого и клинического материала заключается в возможности осуществлять одновременную детекцию и идентификацию всех бактерий в пробе, в том числе известных возбудителей ПОИ, без необходимости проведения нескольких диагностических тестов. Таргетное MGS может применяться для этиологической расшифровки при атипичном течении и стёртой клинической картине заболевания, при микст-инфицировании несколькими возбудителями ПОИ бактериальной этиологии, когда имеется сложность с постановкой диагноза с использованием традиционных лабораторных методов исследования. MGS также может использоваться для получения информации о таксономическом составе бактериального микробиома в организме различных видов носителей и переносчиков возбудителей ПОИ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Рудаков Н.В., Ястребов В.К. Эволюция учения о природной очаговости болезней человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014;(4):4–8. Rudakov N.V., Yastrebov V.K. Evolution of teaching of the natural nidality of human diseases. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2014;(4):4–8. EDN: <https://elibrary.ru/swnymz>
2. Ястребов В.К. Клещевой энцефалит в Сибири: эпидемиология, сочетанность природных очагов. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2007;27(4):89–93. Yastrebov V.K. Tick-borne encephalitis in Siberia: epidemiology, combined natural foci. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2007;27(4):89–93. EDN: <https://elibrary.ru/pjdxjp>
3. Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В. и др. Современное состояние проблемы природно-очаговых инфекций на территории Волгоградской области. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2021;29(11):83–93. Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Borodai N.V., et al. The problem of natural focal infectious diseases in the Volgograd region: a state-of-the-art review. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2021;29(11):83–93. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-11-83-93> EDN: <https://elibrary.ru/qrtwmi>
4. Истомин А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. *Псковский регионологический журнал*. 2006;(1):122–35. Istomin A.V. Regional monitoring over natural-focal infections. *Pskov Regionology Journal*. 2006;(1):122–35. EDN: <https://elibrary.ru/nuhqfd>
5. Демидова Т.Н., Шарапова Н.Е., Горшенко В.В. и др. Эпидемиологическое проявление сочетанных природных очагов туляремии, лептоспирозов и геморрагической лихорадки с почечным синдромом: микстинфекции. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(2):38–45. Demidova T.N., Sharapova N.E., Gorshenko V.V., et al. Epidemiological manifestation of combined natural foci of tularemia, leptospirosis and hemorrhagic fever with renal syndrome: mixed infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(2):38–45. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-2-38-45> EDN: <https://elibrary.ru/fsnrdiv>
6. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2001;(11):41–5. Korenberg E.I. The study and prevention of mixed infections transmitted by ticks. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2001;(11):41–5.
7. Шкарин В.В., Благодравова А.С., Чумаков М.Э. Эпидемиологические особенности сочетанных природно-очаговых инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(5):43–52. Shkarin V.V., Blagoravova A.S., Chumakov E.M. Epidemiological features of combined natural-focal infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(5):43–52. EDN: <https://elibrary.ru/zqolrv>
8. Kingry L., Sheldon S., Oatman S., et al. Targeted metagenomics for clinical detection and discovery of bacterial tick-borne pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e00147–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00147-20>
9. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 1998;5(10):R245–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90108-9)
10. Thoendel M. Targeted metagenomics offers insights into potential tick-borne pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e01893–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01893-20>
11. Ghosh A., Mehta A., Khan A.M. Metagenomic analysis and its applications. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Volume 3*. Elsevier; 2019:184–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7>
12. Rodino K.G., Wolf M.J., Sheldon S., et al. Detection of tick-borne bacteria from whole blood using 16S ribosomal RNA

- gene PCR followed by next-generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2021;59(5):e03129-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.03129-20>
13. Carpi G., Cagnacci F., Wittekindt N.E., et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One.* 2011;6(10):e25604.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025604>
14. Kumar P.S., Brooker M.R., Dowd S.E., Camerlengo T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One.* 2011;6(6):e20956.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020956>
15. Takhampunya R., Korkusol A., Pongpichit C., et al. Metagenomic approach to characterizing disease epidemiology in a disease-endemic environment in Northern Thailand. *Front. Microbiol.* 2019;10:319.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00319>
16. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae*. В кн.: *Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные*. СПб.;1997. Filippova N.A. Ixodidae ticks of Amblyomminae subfamily. In: *Fauna of Russia and Bordering Countries. Arachnids*. St. Petersburg;1997.
17. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., et al. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;4(9):e821.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000821>
18. Abellan-Schneyder I., Matchado M.S., Reitmeier S., et al. Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *mSphere* 2021;6(1):e01202-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
19. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
20. Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12:87.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
21. Keller A., Graefen A., Ball M., et al. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat. Commun.* 2012;3:698.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms1701>
22. Mayne P.J. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis, bartonellosis, and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *Int. J. Gen. Med.* 2011;4:845–52.
DOI: <https://doi.org/10.2147/IJGM.S27336>
23. Krause P.J., Telford S.R., Spielman A., et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA.* 1996;275(21):1657–60.
24. Belongia E.A. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002;2(4):265–73. DOI: <https://doi.org/10.1089/153036602321653851>
25. Курильщиков А.М., Ливанова Н.Н., Фоменко Н.В., Тикунова Н.В. Метагеномный анализ бактериального сообщества, ассоциированного с клещами *Ixodes persulcatus*. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2013;11(4):13–21. Kurilchshikov A.M., Livanova N.N., Fomenko N.V., Tikunova N.V. Metagenomic analysis of bacterial community associated with *Ixodes persulcatus* ticks. *Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine.* 2013;11(4):13–21. EDN: <https://elibrary.ru/rtukux>
26. Norte A. C., Harris D. J., Silveira D., et al. Diversity of microorganisms in *Hyalomma aegyptium* collected from spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) in North Africa and Anatolia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022;69(4):1951–62.
DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14188>
27. Akveran G.A., Karasartova D., Keskin A., et al. Bacterial and protozoan agents found in *Hyalomma aegyptium* (L., 1758) (*Ixodida*: Ixodidae) collected from *Testudo graeca* L., 1758 (Reptilia: Testudines) in Corum Province of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11(5):101458.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101458>
28. Benyahia H., Diarra A.Z., Gherissi D.E., et al. Molecular and MALDI-TOF MS characterisation of *Hyalomma aegyptium* ticks collected from turtles and their associated microorganisms in Algeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2022;13(1):101858.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101858>
29. Kalmár Z., Cozma V., Sprong H., et al. Transstadial transmission of *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115520.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115520>
30. Hepner S., Fingerle V., Duscher G.G., et al. Population structure of *Borrelia turcica* from Greece and Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 2020;77:104050. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104050>
31. Barbour A.G., Gupta R.S. The family *Borreliaceae* (*Spirochaetales*), a diverse group in two genera of tick-borne spirochetes of mammals, birds, and reptiles. *J. Med. Entomol.* 2021;58(4):1513–24. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjab055>
32. Abdelbaset A.E., Nonaka N., Nakao R. Tick-borne diseases in Egypt: a one health perspective. *One Health.* 2022;15:100443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100443>
33. Moraga-Fernández A., Muñoz-Hernández C., Sánchez-Sánchez M., et al. Exploring the diversity of tick-borne pathogens: the case of bacteria (*Anaplasma*, *Rickettsia*, *Coxiella* and *Borrelia*) protozoa (*Babesia* and *Theileria*) and viruses (*Orthonairovirus*, tick-borne encephalitis virus and louping ill virus) in the European continent. *Vet. Microbiol.* 2023;286:109892. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109892>
34. Carpi G., Cagnacci F., Wittekindt N.E., et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One.* 2011;6(10):e25604.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025604>
35. Plummer E., Twin J., Bulach D.M., et al. A comparison of three bioinformatics pipelines for the analysis of preterm gut microbiota using 16S rRNA gene sequencing data. *J. Proteomics Bioinform.* 2015;8(12):283–91.
DOI: <https://doi.org/10.4172/jpb.1000381>
36. Pinna N.K., Dutta A., Monzoorul Haque M., Mande S.S. Can targeting non-contiguous V-regions with paired-end sequencing improve 16S rRNA-based taxonomic resolution of microbiomes?: an *in silico* evaluation. *Front. Genet.* 2019;10:653.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00653>
37. Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., et al. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data.* 2019;6:190007.
DOI: <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
38. Martinez-Porchas M., Villalpando-Canchola E., Ortiz Suarez L.E., Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ.* 2017;5:e3036.
DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3036>
39. Barb J.J., Oler A.J., Kim H.S., et al. Development of an analysis pipeline characterizing multiple hypervariable regions of 16S rRNA using mock samples. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148047.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148047>
40. Hiergeist A., Reischl U., Gessner A. Multicenter quality assessment of 16S ribosomal DNA-sequencing for microbiome analyses reveals high inter-center variability. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016;306(5):334–42.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.005>
41. Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., et al. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014;9(8):e105592.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
42. Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:135.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

Информация об авторах

Васильева Оксана Васильевна — канд. мед. наук, зав. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, vasileva_ov@snipchi.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Ульшина Диана Васильевна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Волынкина Анна Сергеевна — канд. биол. наук, зав. лаб. диагностики вирусных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Писаренко Сергей Владимирович — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, pisarenko_sv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Сирица Юлия Владимировна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Гнусарева Ольга Александровна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Яценко Наталья Александровна — главный врач Краевой специализированной клинической инфекционной больницы, Ставрополь, Россия, natali.yanet@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4353-4777>

Куличенко Александр Николаевич — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов: *Васильева О.В.* — концепция исследования, написание текста; *Ульшина Д.В.* — анализ данных, написание текста; *Волынкина А.С.* — научное редактирование статьи; *Писаренко С.В.* — геномные исследования; *Сирица Ю.В.*, *Гнусарева О.А.*, *Яценко Н.А.* — лабораторные исследования; *Куличенко А.Н.* — 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 20.01.2025;
принята к публикации 29.03.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Oksana V. Vasileva — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, vasileva_ov@snipchi.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Diana V. Ul'shina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Anna S. Volynkina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for diagnostics of viral infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Sergey V. Pisarenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, pisarenko_sv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Yulia V. Siritsa — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Olga A. Gnusareva — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Natalia A. Yatsenko — Chief Physician, Regional Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Stavropol, Russia, natali.yanet@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4353-4777>

Alexandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Authors' contribution: *Vasileva O.V.* — research concept, writing the text; *Ul'shina D.V.* — data analysis, writing the text; *Volynkina A.S.* — science editing the article; *Pisarenko S.V.* — genomic research; *Siritsa Yu.V.*, *Gnusareva O.A.*, *Yatsenko N.A.* — laboratory research; *Kulichenko A.N.* — research concept, article science editing. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors, have made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 20.01.2025;
accepted for publication 29.03.2025;
published 28.04.2025



Получение и очистка рекомбинантных белков VP2 и VP3 вируса *Alongshan* группы *Jingmenvirus* и оценка их иммунохимических свойств

Бондаренко Е.В.[✉], Ермолаева Е.А., Холодилов И.С., Литов А.Г.

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирус *Alongshan* — представитель неклассифицированной группы *Jingmenvirus* (*Flaviviridae*), обнаружен в клещах *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* и различных видах комаров в России, Китае, Финляндии и Франции. В отличие от классических ортофлавивирусов, геном вируса *Alongshan* представлен 4 сегментами РНК положительной полярности. Первый и третий сегменты генома кодируют белки, гомологичные белкам репликативной машинерии ортофлавивирусов, остальные сегменты кодируют предположительно структурные белки, не имеющие известных гомологов: сегмент 2 — VP1a (белок оболочки), VP1b и NuORF; сегмент 4 — VP2 (капсидный) и VP3 (мембранный). Описаны случаи заболевания людей, связанные с вирусом *Alongshan*.

Цель работы — разработка системы экспрессии и очистки рекомбинантных белков VP2 и гидрофильного участка VP3 для проверки их антигенных свойств.

Материалы и методы. Для получения гипериммунных сывороток мышей и рекомбинантных белков в бактериальной системе экспрессии был использован штамм M1ass527 вируса *Alongshan*. Произведены биоинформатический анализ последовательностей, кодирующих целевые белки, генно-инженерное клонирование. Для контроля результатов осуществлены иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ.

Результаты. Рекомбинантные белки вируса *Alongshan* использованы в лабораторной диагностической тест-системе для определения наличия антител к вирусу. Полученный рекомбинантный белок VP2 способен выявлять антитела во всех исследованных сыворотках инфицированных мышей, а также антитела в сыворотках людей как в вестерн-блоттинге, так и в иммуноферментном анализе. При этом антитела к рекомбинантному участку белка VP3 в противовирусных иммунных сыворотках выявлялись нерегулярно.

Заключение. Выявление антител к вирусу *Alongshan* у пациентов подтверждает необходимость дальнейшего исследования данной группы вирусов.

Ключевые слова: группа *Jingmenvirus*, вирус *Alongshan*, диагностика, рекомбинантные белки

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 этическим комитетом Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (протокол № 200923-1 от 20.09.2023).

Источник финансирования. Финансирование работы осуществлялось по государственному заданию FNZG-2024-0001 и государственному заданию FNZG-2024-0008.

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

Для цитирования: Бондаренко Е.В., Ермолаева Е.А., Холодилов И.С., Литов А.Г. Получение и очистка рекомбинантных белков VP2 и VP3 вируса *Alongshan* группы *Jingmenvirus* и оценка их иммунохимических свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):213–222.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-612>

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

Production and purification of recombinant proteins VP2 and VP3 of the *Alongshan* virus of the *Jingmenvirus* group and evaluation of their immunochemical properties

Ekaterina V. Bondarenko[✉], Elena A. Ermolaeva, Ivan S. Kholodilov, Aleksander G. Litov

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Alongshan* virus is a representative of the unclassified group of *Jingmenviruses* (*Flaviviridae*), which is detected in *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* ticks and various mosquito species in Russia, China, Finland and France. Unlike traditional orthoflaviviruses, the *Alongshan* virus genome is represented by 4 positive-sense RNA segments. The first and third segments of the genome encode proteins homologous to proteins of the replicative machinery of orthoflaviviruses, the remaining segments encode putative structural proteins that have no known homologues: segment 2 — VP1a (envelope protein), VP1b and NuORF; segment 4 — VP2 (capsid) and VP3 (membrane). Human cases of *Alongshan* virus-associated disease have been described.

The aim of this study is to develop a system for expression and purification of recombinant VP2 and hydrophilic site VP3 proteins to test their antigenic properties.

Materials and methods. Miass527 strain of *Alongshan* virus was used to produce hyperimmune mouse sera and recombinant proteins in a bacterial expression system. Bioinformatic analysis of sequences encoding target proteins and genetically engineered cloning were carried out in this study. Western blotting and enzyme immunoassay (ELISA) were performed to control the results.

Results. Recombinant proteins of *Alongshan* virus have been used in a laboratory diagnostic test system to determine the presence of antibodies to the virus. The obtained recombinant VP2 protein is able to detect antibodies in all tested sera of infected mice, as well as antibodies in human sera both in Western blotting and in enzyme immunoassay. At the same time, antibodies to the recombinant region of VP3 protein were detected irregularly in antiviral immune sera.

Conclusion. The detection of antibodies to *Alongshan* virus in patients confirms the necessity for further investigation of this group of viruses.

Keywords: *Jingmenvirus* group, *Alongshan* virus, diagnostics, recombinant proteins

Ethics 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 Ethics Committee of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (protocol No. 200923-1, September 20, 2023).

Funding source. The work was funded under the state assignment FNZG-2024-0001 and the state assignment FNZG-2024-0008.

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

For citation: Bondarenko E.V., Ermolaeva E.A., Kholodilov I.S., Litov A.G. Production and purification of recombinant proteins VP2 and VP3 of the *Alongshan* virus of the *Jingmenvirus* group and evaluation of their immunochemical properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):213–222.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-612>
EDN: <https://www.elibrary.ru/ONPICA>

Введение

Представители рода *Orthoflavivirus* (семейство *Flaviviridae*) инфицируют позвоночных и беспозвоночных животных. К этому роду принадлежат такие важные патогены человека, как вирус денге, вирус жёлтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), вирус японского энцефалита и др. Недавно была охарактеризована новая группа вирусов, названная *Jingmenvirus*, которая имеет родство с родом *Orthoflavivirus* [1]. В отличие от классических ортофлавивирусов, *Jingmenvirus* имеют сегментированный РНК геном [2]. Первый и третий сегменты генома *Jingmenvirus* кодируют белки, гомологичные хеликазе и РНК-зависимой РНК-полимеразе ортофлавивирусов [3, 4]. Второй и четвертый сегменты кодируют уникальные белки: белки оболочки VP1a и VP1b, предположительно капсидный белок VP2 и мембранный белок VP3.

Группа *Jingmenvirus* включает в себя такие вирусы, как *Jingmen tick virus*, *Alongshan virus* (ALSV),

Yanggou tick virus и *Takachi virus* [1, 5, 6]. Они имеют широкое географическое распространение и детектируются в кровососущих членистоногих (в особенности в клещах) и млекопитающих, в том числе найдены в сыворотках людей [3, 7–13]. Вирусы ALSV и *Jingmen tick*, по-видимому, могут вызывать острую инфекцию у людей, сопровождающуюся лихорадкой [1, 14–16]. ALSV был впервые обнаружен и выделен из крови больного с лихорадочным заболеванием в Китае [17]. Позднее ALSV был выявлен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) у других больных: было обследовано 86 человек с высокой температурой, головной болью и присасыванием клещей в анамнезе в период с мая по июль 2017 г. [17]. Также вирус был детектирован в клещах *Ixodes persulcatus* и различных видах комаров (*Anopheles yatsushiroensis*, *Aedes vexans*, *Culex pipiens pallens* и *Culex tritaeniorhynchus*) в Китае.

В России в клещах вирус был обнаружен на территориях Калининградской, Челябинской, Улья-

новской областей и в республиках Алтай, Татарстан, Карелия и Тыва [5, 18–20]. В связи с описанными случаями заболевания людей важной задачей являются эпидемиологические исследования представителей группы Jingtmenvirus.

На данный момент не известно, к какому из белков вырабатываются антитела при инфекции, вызванной Jingtmenvirus. Для определения ALSV-специфических антител у овец и крупного рогатого скота в Китае методом иммуноферментного анализа (ИФА) авторами был успешно использован рекомбинантный белок VP2 [17]. ALSV-специфические антитела были обнаружены у 9,2% (22/240) обследованных овец и 4,6% (11/240) обследованного крупного рогатого скота. В 2019 г. финскими учёными были использованы конструкции, кодирующие белки оболочки ALSV VP1a, VP1b, VP2 и VP3, трансфицированные в клетки млекопитающих Vero E6. Эти клетки были использованы для выявления антител в сыворотках 900 пациентов методом иммунофлуоресценции [21].

Цель работы — получение рекомбинантных белков ALSV и использование их в лабораторной диагностической тест-системе для определения наличия антител к вирусу.

Материалы и методы

Вирусы и клетки

Для получения рекомбинантных белков был использован штамм Miass527 ALSV, изолированный из клещей *I. persulcatus*, собранных в 2014 г. в г. Миасс Челябинской области (код доступа NCBI: MN648770–MN648773) [1]. Рекомбинантный белок sE ВКЭ был любезно предоставлен В.С. Барышниковой [22].

Для клонирования были использованы клетки *Escherichia coli*, штамм TOP10 («Promega»), для экспрессии рекомбинантных белков — штаммы JM109 и BL21 («Promega»).

Получение гипериммунных сывороток крови

Для получения гипериммунных сывороток в работе использовали беспородных мышей ICR (Научный центр биотехнологии), которых иммунизировали под кожу ALSV (штамм Miass527) с адьювантом Фрейнда («BD») 3 раза (1 раз в неделю), через 10 дней после последней инъекции тотально забирали кровь (декапитация). Полученные сыворотки от 3 мышей к ALSV использовали в иммуноблоттинге и ИФА. Сыворотка от 1 мыши к ВКЭ (штамм КЭ-328) была любезно предоставлена В.С. Барышниковой [22]. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированной мыши.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального научного центра исследо-

ваний и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (протокол № 200923-1 от 20.09.2023).

Сыворотки условно здорового населения

Сыворотки условно здоровых людей, имеющих антитела к ВКЭ, из Москвы и Московской области были любезно предоставлены Центром гигиены и эпидемиологии в Московской области.

Биоинформатический анализ

Для определения сигнальных пептидов, гидрофильных и гидрофобных участков белков использовали программу «SignalP 4.1 Server»¹, для определения массы белков — программу DNA to Protein на сайте Zbio.net.

Клонирование генов белков VP2 и VP3 вируса Alongshan (штамм Miass527)

Обратную транскрипцию проводили с использованием обратной транскриптазы «Invitrogen SuperScript III» («Thermo Fisher Scientific»).

ПЦР проводили с помощью амплификатора «Veriti 96 Well Thermal Cycler» («Applied Biosystems»), используя полимеразу Platinum Super Fi II («Thermo Fisher Scientific»).

Состав смеси для ПЦР: буфер SuperFi 10 мкл, нуклеотиды 2,5 мМ 1 мкл, праймеры по 1 мкл, полимеразы Platinum SuperFi II 1 мкл, кДНК 2 мкл, вода 32 мкл. Общий объём 50 мкл.

Программа ПЦР для полимеразы Platinum Super Fi II:

- 98°C 30 с;
- 98°C 10 с;
- 60°C 10 с;
- 72°C 30 с/30 циклов;
- 72°C 5 мин.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции:

- *Bam*HI и *Hind*III («Thermo Fisher Scientific») для плазмиды pQE32 («Qiagen») и ампликонов VP2 и VP3;
- *Bam*HI и *Xho*I («Thermo Fisher Scientific») для плазмиды pet28a+ (коллекция плазмид ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) и ампликона VP2.

После рестрикции полученные векторы и вставки наносили на 1% агарозный гель («Пан-Эко») на основе 1xTBE буфера: 0,09 М Трис («ДиаМ»), 0,09 М H₃BO₃ («Пушкинские лаборатории»), 2 мМ EDTA («ДиаМ») и очищали с помощью центрифужных колонок («Qiagen»).

Концентрацию ДНК измеряли по оптической плотности на приборе «NanoDrop One» («Thermo

¹ SignalP 4.1 Server».

URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>

Fisher Scientific»). Реакцию лигирования проводили с помощью лигазы T4 DNA («Thermo Fisher Scientific»). Вектор и вставку брали в соотношении 5 : 1.

Клетки *E. coli* TOP10 трансформировали полученными лигазными смесями методом теплового шока и растили в среде LB (табл. 1) при 37°C. Наличие вставки проверяли методом ПЦР с праймерами для клонирования. С помощью метода секвенирования по Сэнгеру подтверждали наличие тэга 6 гистидинов, старт и стоп кодонов, отсутствие несинонимических замен. Секвенирование проводили с помощью набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific») на приборе «Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer» («Waltham»).

Трансформация и культивирование клеток *E. coli* при экспрессии

При трансформации для экспрессии белков использовали штаммы: для плазмиды pQE32 — штамм JM109, для pet28a+ — штамм B121. Для культивирования клеток использовали среды: LB, SOB и TB (табл. 1).

Затем отбирали одну колонию клеток с чашки Петри и растили её в 5 мл среды с добавлением антибиотика 100 нг/мл (ампициллин — для pQE32, канамицин — для pet28a+) в течение 18 ч. Далее клеточную суспензию переносили в 250 мл среды с ампициллином 100 нг/мл или канамицином 50 нг/мл. При достижении клеточной массы оптической плотности 0,5–0,8 при длине волны 600 нм ($9,6 \times 10^9$ клеток/мл) добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ; «Helicon»). Инкубировали клетки при различной температуре и времени при перемешивании. Далее клеточную массу осаждали центрифугированием при 1700g, 4°C в течение 30 мин, полученный осадок промывали 50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS; «Sigma-Aldrich»).

Таблица 1. Состав сред для индукции экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* JM109 и B121

Среда	Ингредиенты	Концентрация, г/л
LB	Триптон («ДиаМ»)	10
	Дрожжевой экстракт («Sigma-Aldrich»)	5
	NaCl («Fluka»)	10
SOB	Триптон	20
	Дрожжевой экстракт	5
	NaCl	0,585
	KCl («Fluka»)	0,185
TB	Триптон	12
	Дрожжевой экстракт	24
	Глицерин 99% («Sigma-Aldrich»)	20*

Примечание. *Концентрация глицерина указана в мл/л.

Условия, при которых проводили экспрессию рекомбинантных белков, если не указано иного: время инкубации клеток — 12 ч в среде LB при 37°C и концентрации ИПТГ 0,5 мМ.

Разрушение клеток ультразвуком

Клеточную массу переосаждали в 20 мл лизирующего буфера (HEPES 100 мМ («ДиаМ»), NaCl 0,15 М, pH 8,5) и обрабатывали ультразвуком (прибор «Soniprep 150», «MSE») следующим образом: 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. Далее клетки центрифугировали (7800g, 4°C, 30 мин), осадок ресуспензировали в 20 мл лизирующего буфера с 8 М мочевиной (для выхода белка в растворимую фракцию) и обрабатывали ультразвуком 1 раз 30 с, после чего центрифугировали (7800g, 4°C, 30 мин).

Выделение и очистка рекомбинантных белков

Очистку рекомбинантных белков проводили методом аффинной хроматографии с помощью готового набора для выделения Ni-NTA Fast Start («Qiagen»).

Смену буфера на PBS и концентрирование проводили с помощью центрифужных ультрафильтров «Amicon Ultra-15» 10 кДа («Merck»).

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (ПААГ-SDS). Для определения концентрации целевых белков использовали калибровочный график, построенный по известным концентрациям BSA («Genesystool»). Далее концентрацию целевого белка измеряли с помощью прибора «GBox» («Syngene») в программе «GeneTools» («Syngene»).

Получение отрицательного контроля (Mock)

Для получения отрицательного контроля (Mock) были проведены те же манипуляции с плазмидами pQE-32 и pet28a+ без вставки, что и с конструкциями со вставкой: трансформация, культивирование соответствующих бактериальных клеток, экспрессия, выделение и очистка. Далее контроль использовали для визуализации в ПААГ, иммуноблоттинге и ИФА.

Иммуноблоттинг

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 15% ПААГ-SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). Мембрану инкубировали с 5% обезжиренным коровьим молоком («Best Value») в трис-солевом буфере (TBS: 25 мМ Tris, 0,15 М NaCl, pH 8,3) в течение 1 ч.

Затем мембрану инкубировали с целевой сывороткой 1 ч: мыши, человека или к гистидиновому тэгу. Далее промывали мембрану TBS с 0,05% Твин-20

(TBS-T) и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена (HRP) антителами против IgG мыши или человека соответственно («Abcam») в течение 1 ч. В случае использования HRP-меченных антител к гистициновому тэгу («Abcam») инкубирование со вторичными мечеными антителами не требуется.

Перед проявлением мембрану снова промывали TBS-T, затем проявляли с использованием набора «ECL» («Bio-Rad») в гель-документирующей системе «Genesys» («Genesys»).

Иммуноферментный анализ

В лунку 96-луночного планшета вносили 80 нг белка, разведённого в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали PBS, инкубировали с 4% обезжиренным коровьим молоком («Best Value») в PBS в течение 1 ч, затем с сыворотками мышей в PBS с 0,05% Твин-20 1 ч. Планшет промывали, инкубировали с HRP-конъюгированными антителами против мышинового IgG («Abcam») соответственно в течение 1 ч, после чего промывали и вносили субстрат ТМВ («Sigma-Aldrich»), через 30 мин реакцию останавливали 2 М серной кислотой («Ленреактив»). Результаты детектировали при длине волны 450 нм на спектрофотометре («Thermo Fisher Scientific»).

Результаты

Выбор и получение мишеней для клонирования

В нашей работе был выбран предположительно капсидный белок VP2, т. к. китайскими учёными уже были обнаружены антитела у крупного рогатого скота к данному белку [13], а также мембранный белок VP3, который был клонирован впервые в нашей работе. Белки кодируются в 4-м сегменте генома ALSV.

Для белка VP2 была определена последовательность сигнального пептида (19 ак), гидрофобных участков он не имеет — для клонирования был выбран участок без сигнального пептида 243 ак, т. к. он мог затруднить последующее выделение белка. Белок VP3 содержит 9 трансмембранных гидрофобных доменов — для клонирования были выбраны гидрофильные участки 1–89 и 244–389 ак

(рис. 1). Предположительные размеры белков: VP2 — 25 кДа, а гидрофильные участки белка VP3-1 и VP3-2 — 10 и 18 кДа соответственно.

Далее на основании нуклеотидных последовательностей белка VP2 и гидрофильных участков белка VP3 были подобраны праймеры (табл. 2) и получены соответствующие ПЦР-продукты (рис. 2).

Получение векторных конструкций

Конструкция со вставкой участка 244–389 ак белка VP3 на основе вектора pQE-32 оказалась удачной (рис. 3, 4). Однако с другими вставками на

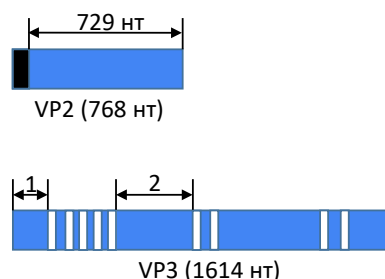


Рис. 1. Схематическое изображение целевых участков VP2 и VP3 для клонирования.

Черный фрагмент — сигнальный пептид белка VP2, белые — трансмембранные домены белка VP3. 1 — участок белка VP3 1–267 ак, 2 — участок белка VP3 244–389 ак.

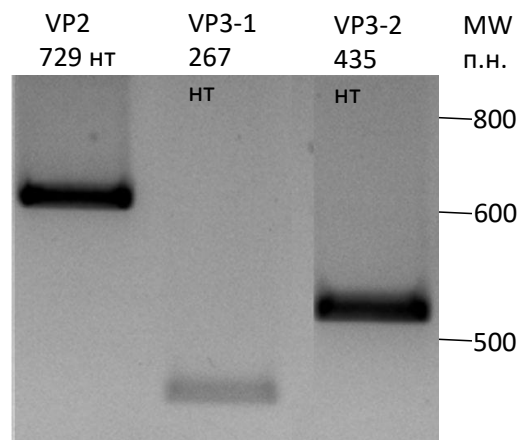


Рис. 2. Электрофоретический анализ ампликонов целевых участков гена белков VP2 и VP3.

MW — маркер длины ДНК. VP2 — участок, кодирующий 1-89 ак; VP3 — участок, кодирующий 244–389 ак VP3.

Таблица 2. Праймеры для клонирования белка VP2 и гидрофильного участка белка VP3

Праймер	Последовательность, 5'→3'	Участок генома на основе последовательности вируса Alongshan (GenBank #MN648773.2)
VP2-28s	GAGCTAGGATCCAAGCCAAACGGAGCCCCAGAT	168–188
VP2-28as	GAGCTACTCGAGCTACTGAAAAACCTGGTAGTTG	857–872
VP3s 244–389	GAGCTAGGATCCGACAAGGATCAAGCCTACCTC	1576–1597
VP3as 244–389	TAGCTCAAGCTTCCATTGGGTGTAGACCAGGT	1998–2017
MiVP3s 1–89	GCTAGGATCCGTGCGACCCCAACTACCAGGT	848–868
MiVP3as 1–89	TAGCTCAAGCTT TCTCTCCTCCAGTCGCC	1095–1114

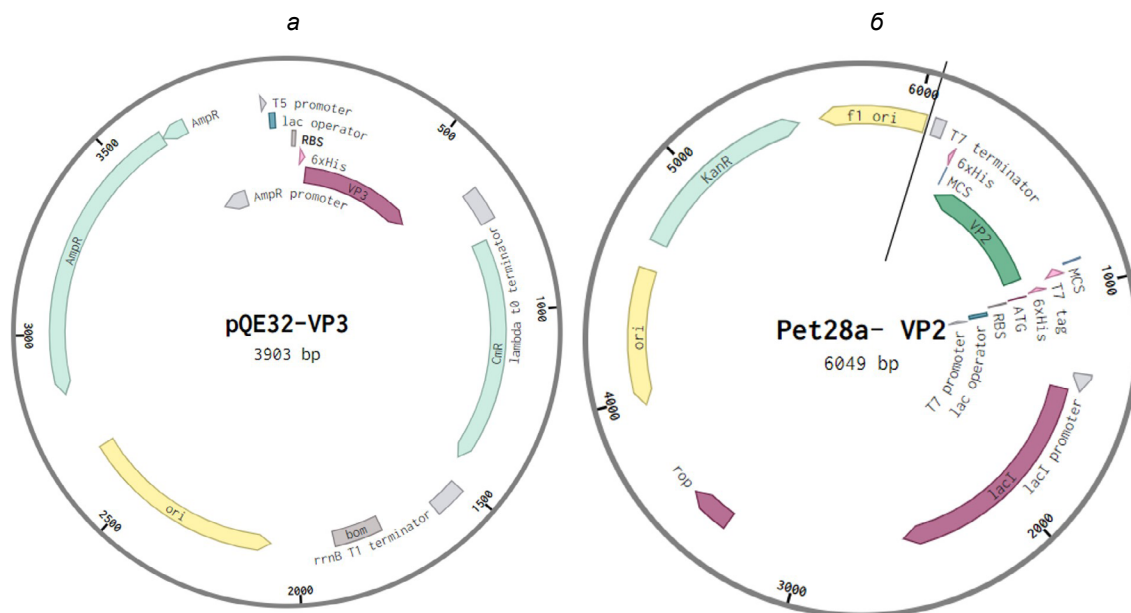


Рис. 3. Генно-инженерные конструкции, с которыми была показана экспрессия.

а — конструкция плазмиды pQE-32 и участка белка VP3; б — конструкция плазмиды pet28a и участка белка VP2.

AmpR — ген устойчивости к ампициллину; *lac operator* — лактозный оператор; bp — нуклеотиды; *KanR* — ген устойчивости к канамицину; RBS — сайт посадки рибосомы; 6xHis — сайт 6 гистидинов; MCS — сайты рестрикции.

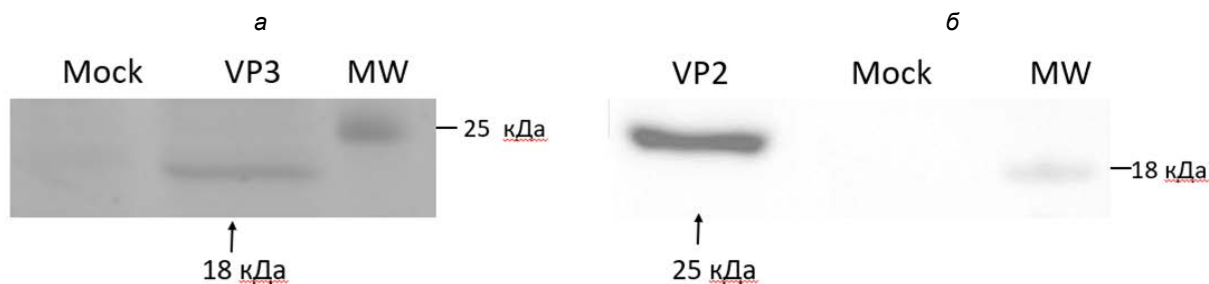


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга рекомбинантных белков VP3 (а) и VP2 (б) с антителами к гистидину.

основе вектора pQE-32 экспрессия рекомбинантных белков либо не происходила (в случае вставки VP2), либо приводила к гибели бактериальных клеток на 3 ч культивирования (в случае вставки участка 1–267 ак белка VP3), что говорит о возможной токсичности белка для данных бактериальных клеток. В связи с этим нами было принято решение собрать новую генно-инженерную конструкцию плазмиды pET28a+ со вставкой белка VP2 (рис. 3).

Успешность экспрессии белков в конструкциях pQE-32-244-389 и pet28a-VP2 была подтверждена с использованием антител к гистидиновой метке. Оба рекомбинантных белка показали положительные результаты в вестерн-блоте (рис. 4). Культивирование клеток проходило при условиях: среда LB, 37°C, концентрация ИПТГ 0,5 мМ, 12 ч.

Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных белков

Для повышения выхода белков был предпринят ряд экспериментов. Оптимизировали следующие параметры: среду культивирования клеток,

длительность инкубации с ИПТГ, концентрацию ИПТГ и температуру роста клеток. На **рис. 5** показано, что наибольшая концентрация целевого белка VP3 достигается при добавлении 0,5 мМ ИПТГ при росте бактерий 12 ч при 37°C. Использование различных сред LB, SOB и TB не влияло на экспрессию рекомбинантного участка белка VP3 (рис. 5, в).

В связи с этим нами были определены рабочие условия экспрессии целевого белка — культивирование клеток в течение 12 ч с концентрацией индуктора лактозного оператора 0,5 мМ при 37°C в среде LB.

Изменения условий среды, концентрации ИПТГ и температуры не повлияли на экспрессию рекомбинантного белка VP2 в клетках *E. coli*, штамм BL21 (**рис. 6**), но при увеличении времени роста клеток бактерий экспрессия увеличивалась.

Поскольку среда для бактерий, температура их роста и концентрация ИПТГ не повлияли на экспрессию рекомбинантного белка VP2, нами были выбраны рабочие условия экспрессии: культивирование клеток в течение 12 ч при 37°C с концентрацией индуктора лактозного оператора 0,5 мМ в среде LB.

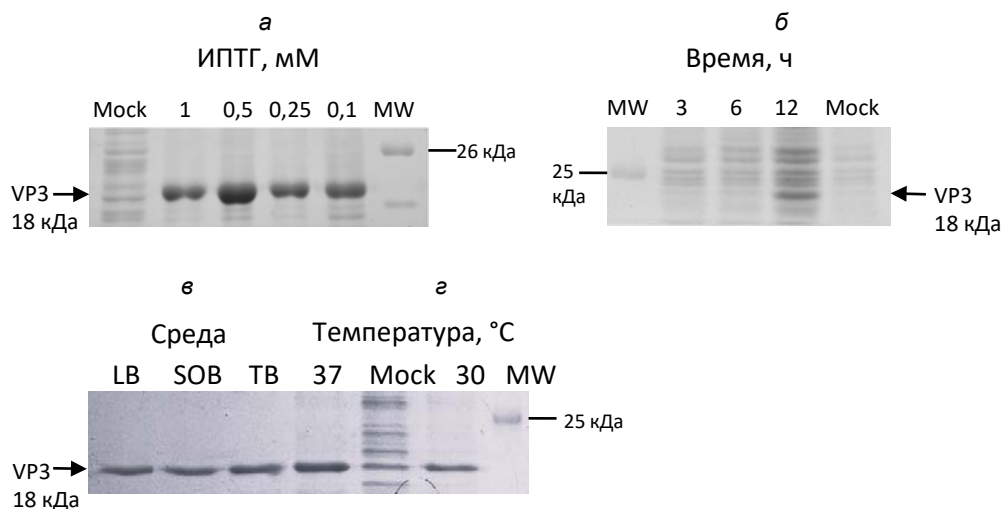


Рис. 5. Электрофоретический анализ рекомбинантного участка белка VP3 244–389 ак в ПААГ при различных концентрации ИПТГ (а), времени (б), среде (в) и температуре (г) экспрессии для целевого белка.

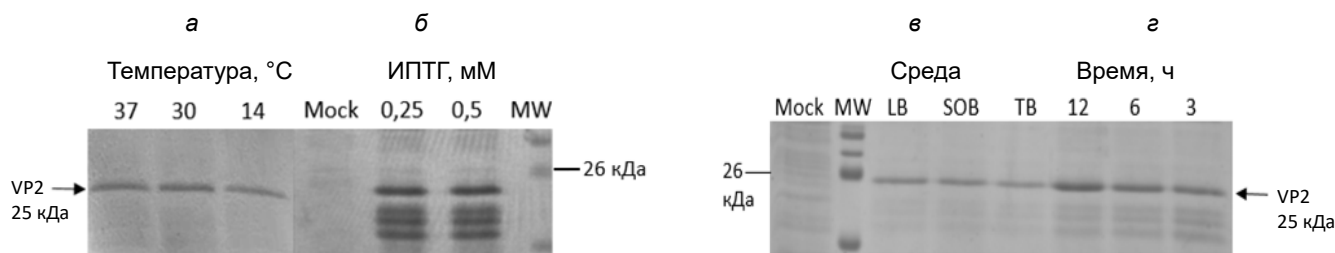


Рис. 6. Электрофоретический анализ рекомбинантного участка белка VP2 в ПААГ при различных температуре (а), концентрации ИПТГ (б), среде (в) и времени (г) экспрессии для целевого белка.

Выделение рекомбинантных белков

Одним из важных этапов для дальнейшего выделения белков является определение их растворимости. Для рекомбинантного участка белка VP3 было определено, что он находится в растворимой фракции без мочевины (рис. 7). Целевой белок VP2 находится в нерастворимой фракции (с 8 М мочевиной), что могло затруднить его дальнейшее получение и очистку. При этом добавление ингибиторов сериновых протеаз, которое может повлиять на растворимость белка, не дало результатов — для выделения рекомбинантного белка VP2 необходимо добавление мочевины.

Далее рекомбинантные белки очищали на гравитационной колонке методом аффинной хроматографии (рис. 8). После обессоливания и концентрирования на центрифужных фильтрах измеряли концентрацию белков по методу Брэдфорда: для рекомбинантного участка белка VP3 она составила 70 мкг/мл, для белка VP2 — 120 мкг/мл (при экспрессии белков в 250 мл среды с клеточной массой).

С помощью вестерн-блота и использования гипериммунных мышинных сывороток к ALSV была показана способность рекомбинантного белка VP2 взаимодействовать с противовирусными антителами. Были проверены 3 гипериммунные мышинные сыворотки — белок VP2 взаимодей-

ствовал со всеми, в то время как рекомбинантный участок белка VP3 был выявлен только с одной. В качестве примера на рис. 9 приведён иммуноблот рекомбинантных белков VP2 и VP3 с гипериммунной мышинной сывороткой. В качестве отрицательной сыворотки в вестерн-блоте была использована сыворотка неиммунизированной мыши.

Для доказательства специфичности рекомбинантного белка VP2 в вестерн-блоте также использовали мышинные сыворотки к ВКЭ (рис. 10). В качестве положительного контроля служил рекомбинантный белок ВКЭ sE [22]. Полученный нами белок VP2 не связывался с антителами к ВКЭ.

Результаты вестерн-блот-анализа были подтверждены в ИФА с мышинной гипериммунной сывороткой к ALSV (рис. 11). Для определения рабочей концентрации рекомбинантных белков в ИФА были проверены разные концентрации белка (20, 40, 80 и 120 нг/лунку) и разведение сыворотки (1 : 180 и 1 : 360). Оптимальной оказалась концентрация белка 80 нг/лунку. В качестве отрицательного контроля использовалась сыворотка неиммунизированной мыши. Для дополнительного подтверждения результатов мышинная гипериммунная сыворотка к ALSV также была проверена в ИФА, где в качестве подложки использовалась плазида, с которой были произведены все те же манипуляции, что и с

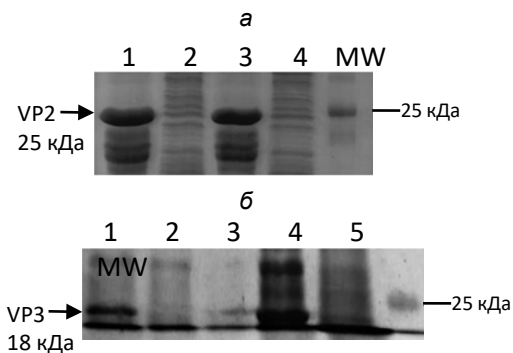


Рис. 7. Определение фракций целевых белков VP2 (а) и VP3 (б) в ПААГ.

а — лизат клеток после сонификации в лизирующем буфере: 1 — с 8 М мочевиной; 2 — без добавок; 3 — с 8 М мочевиной и ингибиторами сериновых протеаз; 4 — с ингибиторами сериновых протеаз. б — клеточный лизат после 12 ч культивирования (1), Mock (2), лизат клеток до добавления ИПТГ (3), лизат клеток после сонификации в лизирующем буфере (4), фракция осадка с 8 М мочевиной (5).

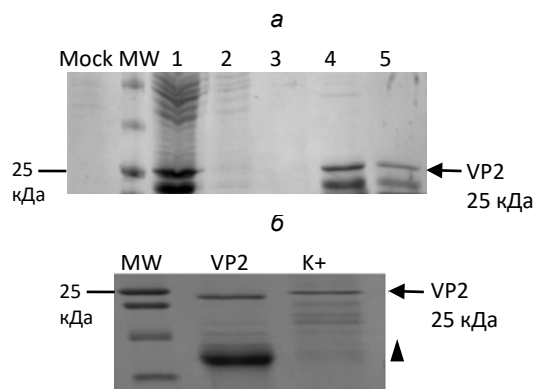


Рис. 8. Выделение целевого белка VP2 в ПААГ с помощью набора «Qiagen Ni-NTA Fast Start» (а) и обессоливание с помощью амиконов (б).

а: 1 — белок VP2 в лизирующем буфере с 8 М мочевиной; 2 — фракция проскока; 3 — фракция промывки колонки wash-буфером; 4 — элюат, содержащий целевой белок; 5 — элюат, содержащий продукты деградации белка. б — рекомбинантный белок VP2 и продукты его деградации (обозначение: треугольник); K+ — положительный контроль.

плазмидой со вставкой и рекомбинантным белком при выделении (Mock).

Положительные результаты ИФА и вестерн-блот позволяют использовать белок VP2 для детекции антител против ALSV в сыворотках.

Анализ сывороток условно здоровых людей

С помощью полученных нами рекомбинантных белков были проверены 30 сывороток условно здоровых людей из Москвы и Московской области, имеющих антитела к ВКЭ. При анализе методом ИФА использовали образцы целевого белка в концентрации 80 нг/лунку, в качестве отрицательного контроля в подложке был использован Mock (имел ту же концентрацию по общему белку), а в качестве отрицательной сыворотки — сыворотка условно здорового человека, не имевшего антитела к ВКЭ.

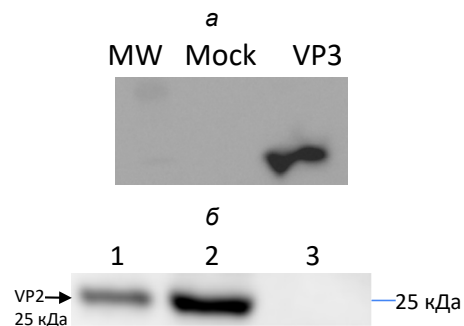


Рис. 9. Результаты иммуноблотинга целевого белка с сывороткой мыши, иммунизированной вирусом Alongshan (штамм Miass527).

а — экспрессия рекомбинантного белка VP3; б — лизат клеток после экспрессии рекомбинантного белка VP2 (1), выделенного и обессоленного рекомбинантного белка VP2 (2), Mock (3). Для детекции использовали HRP-меченные антитела против IgG мыши («Abcam»).

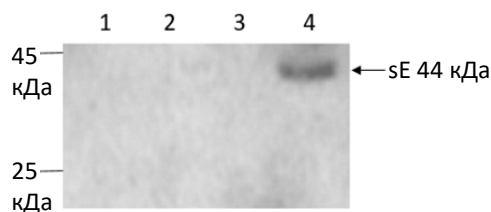


Рис. 10. Результаты иммуноблотинга целевого белка мышинной гипериммунной сыворотки к ВКЭ (штамм КЭ-328).

Для детекции использованы HRP-меченные антитела против IgG мыши («Abcam»). 1 — выделенный и обессоленный рекомбинантный белок VP2; 2 — Mock; 3 — лизат клеток СПЭВ без вируса ВКЭ; 4 — рекомбинантный белок sE размером 44 кДа [22].

Таким образом, была выявлена 1 сыворотка, содержащая антитела к белку VP2 ALSV. К рекомбинантному участку 244–389 ак белка VP3-антител не обнаружено.

Для подтверждения результатов ИФА нами был проведён вестерн-блот положительной в ИФА сыворотки пациента (рис. 12).

Обсуждение

Ранее белок VP2 уже был получен китайскими учёными с помощью вектора pET30a, который экспрессировали при 15°C в клетках BL21 (DE3) *E. coli* [17]. В нашей работе было показано, что белок VP2 успешно экспрессируется с использованием плазмиды плазмиды pet28a(+), также была опробована низкая температура культивирования клеток, но это не повлияло на уровень экспрессии рекомбинантного белка. Эффективное выделение рекомбинантного белка VP2 проходит при добавлении 8 М мочевины. При этом было показано, что впервые полученный нами рекомбинантный участок белка VP3 (вектор pQE-32) является растворимым. Выход целевого продукта выше с вектором pet28a(+), чем с pQE-32, при этом полученных

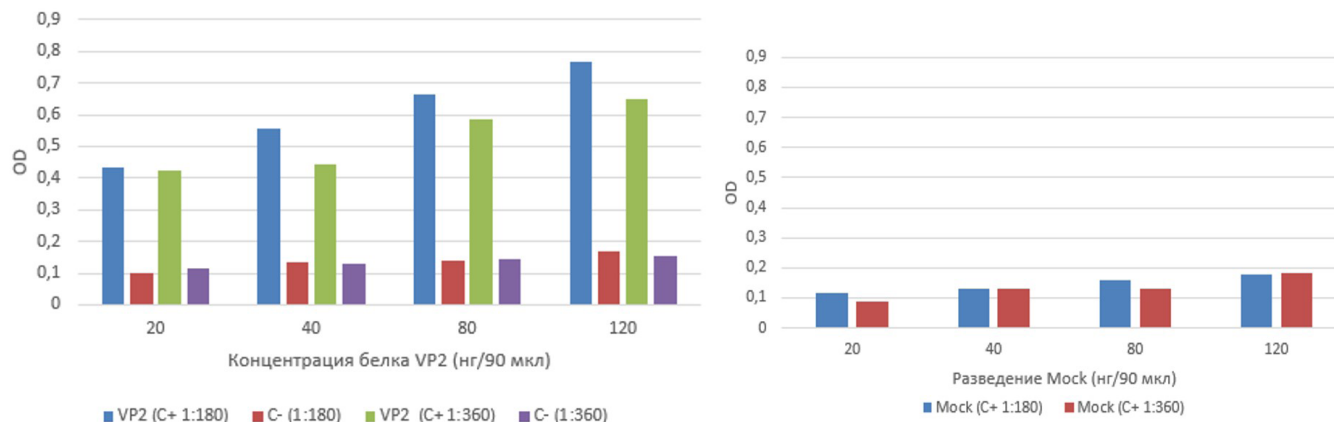


Рис. 11. Анализ мышинной гипериммунной сыворотки к вирусу Alongshan M1ass527 с рекомбинантным белком VP2 (а) и Mock (б).

Лунки 96-луночного планшета сенсibilizировали раствором белка VP2; в анализе использована гипериммунная мышинная сыворотка к вирусу Alongshan (С+) и сыворотка неиммунизированной мыши (С-) с указанными на рисунке разведениями. Для детекции использованы HRP-меченные антитела против IgG мыши («Абсам»).

концентраций обоих белков достаточно для многократного проведения ИФА.

С помощью рекомбинантного белка VP2 были выявлены антитела у крупного рогатого скота в Китае [17]. В нашей работе мы подтвердили, что белок VP2 обладает антигенными свойствами в иммуноблоте и ИФА. Впервые нами было показано, что полученный нами рекомбинантный пептид VP2 ALSV штамм M1ass527 не имеет антигенных перекрестов с ВКЭ в вестерн-блоте. Показано, что при иммунизации мышей живым ALSV более регулярно синтезируются антитела к рекомбинантному белку VP2 и менее регулярно — к рекомбинантному участку белка VP3. Возможно, это связано с различным спектром антител в полученных мышинных сыворотках — белок VP2 взаимодействует с большим спектром антител, выработанных на разных этапах инфекции. Также в ИФА были обнаружены антитела у условно здорового человека с укусом клеща в анамнезе к рекомбинантному пептиду VP2, а к рекомбинантному пептиду VP3 антител в сыворотках людей не обнаружено.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Wang Z.D., Wang B., Wei F., et al. A new segmented virus associated with human febrile illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019;380(22):2116–25. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>
- Ackermann M., Padmanabhan R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* 2001;276(43):39926–37. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104248200>
- Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S., et al. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 2015;13(7):e1002210. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210>
- Qin X.C., Shi M., Tian J.H., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(18):6744–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>




Рис. 12. Результаты иммуноблотинга целевого белка с сывороткой условно здорового человека. Для детекции использовали HRP-меченные антитела против IgG человека («Абсам»).

- Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020;12(4):362. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040362>
- Kholodilov I.S., Belova O.A., Ivannikova A.Y., et al. Distribution and characterisation of tick-borne flavi-, flavi-like, and phenuiviruses in the Chelyabinsk region of Russia. *Viruses.* 2022;14(12):2699. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14122699>
- Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014;109(1):38–50. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
- Vandegrift K.J., Kapoor A. The ecology of new constituents of the tick virome and their relevance to public health. *Viruses.* 2019;11(6):529. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11060529>
- Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016;20(3):357–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
- Kobayashi D., Kuwata R., Kimura T., et al. Detection of jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks. *Viruses.* 2021;13(12):2547. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13122547>
- Temmam S., Bigot T., Chrétien D., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of jingmenviruses. *mSphere.* 2019;4(6):e00645–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00645-19>
- Diñçer E., Hacıoğlu S., Kar S., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses.* 2019;11(11):1071. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11111071>
- Pascoal J.O., Siqueira S.M., Maia R.D.C., et al. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*

- 2019;10(1):162–5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.002>
14. Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенцова А.О. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020;75(2):129–34. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Sementsova A.O., et al. Detection of the RNA for new multicomponent virus in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Russia. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2020;75(2):129–34. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn1192>
EDN: <https://elibrary.ru/jfodao>
 15. Taniguchi S. Detection of Jingmen tick virus in human patient specimens: emergence of a new tick-borne human disease? *EBioMedicine*. 2019;43:18–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.034>
 16. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: a retrospective study. *EBioMedicine*. 2019;43:317–24.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
 17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors*. 2019;12(1):450.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
 18. Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Курушина В.Ю. и др. Встречаемость и генетическое разнообразие вируса Алонгшан (*Flaviviridae*), выявленного в клещах на юге Вос- точной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2024;69(2):151–61. Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Kurushina V.Yu., et al. Prevalence and genetic diversity of the Alongshan virus (*Flaviviridae*) circulating in ticks in the south of Eastern Siberia. *Problems of Virology*. 2024;69(2):151–61. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-223>
EDN: <https://elibrary.ru/jwvfoe>
 19. Morozkin E.S., Makenov M.T., Zhurenkova O.B., et al. Integrated *Jingmenvirus* polymerase gene in *Ixodes ricinus* genome. *Viruses*. 2022;14(9):1908.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v14091908>
 20. Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses*. 2021;13(3):458.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v13030458>
 21. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro. Surveill.* 2019;24(27):1900394.
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.27.1900394>
 22. Барышникова В.С., Турченко Ю.В., Шишова А.А. и др. Рекомбинантный гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы. *Биотехнология*. 2022;38(6):73–83. Baryshnikova V.S., Turchenko Yu.V., Shishova A.A., et al. Recombinant glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus for a developing differentiated test system. *Biotechnologiya*. 2022;38(6):73–83. DOI: <https://doi.org/10.56304/S0234275822060023>
EDN: <https://elibrary.ru/hzfkfv>

Информация об авторах

Бондаренко Екатерина Владимировна  — м. н. с. лаб. биохимии ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, bondarenko_ev@chumakovs.su, katebondlie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5972-0761>

Ермолаева Елена Александровна — м. н. с. лаб. биохимии ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, le.ermolaeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0406-0604>


Холодильов Иван Сергеевич — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. биологии арбовирусов ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, ivan-kholodilov@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Литов Александр Геннадьевич — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. биологии арбовирусов ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, novosti-wxo@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6086-3655>

Участие авторов: Бондаренко Е.В., Ермолаева Е.А. — визуализация, написание и подготовка рукописи; Холодильов И.С., Литов А.Г. — руководство и научное 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 23.01.2025;
принята к публикации 27.03.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Ekaterina V. Bondarenko  — junior researcher, Laboratory of biochemistry, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, bondarenko_ev@chumakovs.su, katebondlie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5972-0761>

Elena A. Ermolaeva — junior researcher, Laboratory of biochemistry, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, le.ermolaeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0406-0604>

Ivan S. Kholodilov — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of arboviruses biology, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, ivan-kholodilov@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Alexander G. Litov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of arboviruses biology, M.P. Chumakov Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russia, novosti-wxo@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6086-3655>

Authors' contribution: Bondarenko E.V., Ermolaeva E.A. — visualization, writing and preparation of manuscript; Kholodilov I.S., Litov A.G. — management and scientific 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 23.01.2025;
accepted for publication 27.03.2025;
published 28.04.2025

НАУКА И ПРАКТИКА

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-638>



Эффекторные молекулы стрептококков как перспективные противоопухолевые средства: плюсы и минусы

Суворов А.Н.^{1, 2✉}, Цапиева А.Н.¹, Чернов А.Н.^{1, 3✉}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Онкологические заболевания остаются одной из основных причин инвалидности и смертности населения во всём мире. К наиболее злокачественным типам рака относятся опухоли поджелудочной железы, печени и головного мозга. Современные методы терапии (в том числе химиолучевая, таргетная, иммунная терапия) не позволяют добиться желаемой эффективности у этой группы пациентов. В этой связи необходимы новые подходы для терапии онкологических заболеваний.

Целью обзора явилось обсуждение механизмов противоопухолевого действия *Streptococcus pyogenes* и других видов стрептококков, а также рассмотрение их опухольстимулирующих эффектов и существующих при этом ограничений.

В обзоре рассмотрено современное состояние проблемы использования бактериальной онкотерапии с участием стрептококков группы А (в частности, *S. pyogenes*). Обсуждается участие факторов патогенности *S. pyogenes*: М-белка, экзотоксинов: стрептолизина S, O, суперантигенов, аргининдеиминазы и др., а также молекулярные механизмы, опосредованные клетками иммунной системы организма-носителя. Собственные данные авторов показывают, что для *S. pyogenes* обнаружена селективная опосредованная М-белком цитолитическая активность в отношении опухолевых клеток глиомы С6 и аденокарциномы поджелудочной железы и её отсутствие на нормальных фибробластах. Кратко суммируются данные по доклиническому и клиническому применению полученного на основе стрептококков препарата ОК-432 для терапии онкологических заболеваний. Обсуждаются и опухоль-ассоциированные свойства стрептококков (индукция секреции цитокинов, пролиферации, миграции и ангиогенеза эпителиальных клеток сосудов, образование внеклеточных ловушек нейтрофилов из микроокружения опухоли), обусловленные их взаимодействием с клетками иммунной системы организма-опухоленосителя.

Заключение. Представленные в обзоре научные данные убедительно показывают, что *S. pyogenes* могут при участии факторов патогенности непосредственно оказывать противоопухолевое действие на раковые клетки. Однако стрептококковую вакцину следует применять с осторожностью, учитывая индивидуальные особенности иммунной системы пациента, поскольку *S. pyogenes* могут оказывать и эффекты противоположного характера, требующие дальнейших исследований.

Ключевые слова: обзор, *Streptococcus pyogenes*, противоопухолевые механизмы, факторы патогенности, иммунная система, опухоль-ассоциированные механизмы, онколитические эффекты, бактериальные противоопухолевые препараты

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания № 075-00397-25-00.

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

Для цитирования: Суворов А.Н., Цапиева А.Н., Чернов А.Н. Эффекторные молекулы стрептококков как перспективные противоопухолевые средства: плюсы и минусы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2025;102(2):223–238.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-638>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-638>

Streptococcal effective molecules as promising anticancer agents: pros and cons

Alexander N. Suvorov^{1, 2✉}, Anna N. Tsapieva¹, Alexander N. Chernov^{1, 3✉}¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia;²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Oncological diseases remain the main cause of death and disability of the population worldwide. The most malignant types of cancer include of pancreas, liver and brain tumors. Modern methods of therapy (including chemoradiation, targeted and immune therapy) do not allow achieving the desired effectiveness in this group of patients. In this regard, new approaches to the treatment of oncological diseases are needed.

The aim of this review was to discuss the mechanisms of anticancer action of *Streptococcus pyogenes* and other streptococcal species, as well as to consider their cancer-stimulating effects and their limitations.

The review considers the current state of the problem of using bacterial oncotherapy involving streptococci A group (in particular, *S. pyogenes*). The involvement of *S. pyogenes* pathogenicity factors is discussed: M-protein, exotoxins: streptolysins S, O, superantigens, arginine deiminase, etc., as well as molecular mechanisms mediated by the host immune system cells. The authors' own data show that *S. pyogenes* exhibits selective M-protein-mediated cytolytic activity against C6 glioma and pancreatic adenocarcinoma (Panc) tumor cells and no activity against normal fibroblasts. The data on preclinical and clinical application of the streptococcal-based medicine OK-432 for the therapy of oncological diseases are briefly summarized. Tumor-associated properties of streptococci (induction of cytokine storm, proliferation, migration and angiogenesis of vascular epithelial cells, formation of neutrophil extracellular traps in the tumor microenvironment) caused by their interaction with immune cells of the tumor-bearing organism are also discussed.

Conclusion. The research data presented in this review convincingly demonstrate that *S. pyogenes*, with the participation of pathogenicity factors, can directly exert an antitumor effect on cancer cells. However, it should be noted the streptococcal vaccine should be used with caution, taking into account the individual characteristics of the patient's immune system, since *S. pyogenes* can also have effects of the opposite nature, requiring further research.

Keywords: review, *Streptococcus pyogenes*, antitumor mechanisms, pathogenicity factors, immune system, cancer-associated mechanisms, oncolytic effects, bacterial antitumor drugs

Funding source. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, No. 075-00397-25-00.

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

For citation: Suvorov A.N., Tsapieva A.N., Chernov A.N. Streptococcal effective molecules as promising anticancer agents: pros and cons. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):223–238.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-638>EDN: <https://www.elibrary.ru/NXCMRV>

Введение

Онкологические заболевания являются одной из основных причин инвалидности и смертности населения во всём мире, уступая лишь сердечно-сосудистой патологии [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения и Международного агентства по изучению рака (Globocan), в мире в 2022 г. зарегистрировано 19 976 499 новых случаев заболеваний раком, из которых 9 743 832 закончились летальным исходом (48,8%)¹. К 2045 г.

заболеваемость и смертность от рака увеличатся на 55% и достигнут 31,0 и 16,7 млн случаев соответственно.

Научные достижения последнего времени в биологии, медицине и онкологии ознаменовались открытием раковых стволовых клеток, горизонтальным переносом генетической информации (мобильные генетические элементы), появлением новых генетических методов диагностики: полногеномного и полноэкзомного секвенирования. Эти и другие достижения способствовали изменению парадигмы лечения с когортной на индивидуальную, что привело к появлению новых научных направле-

¹ International Agency for Research of Cancer (Globocan).

URL: <https://globocan.iarc.fr>

ний: таргетной и иммунотерапии, которые вселили надежду на излечение многих типов рака [2, 3].

С другой стороны, все эти успехи в онкологии вызвали новые проблемы, связанные с установлением молекулярно-клеточной гетерогенности опухолей, развитием множественной лекарственной устойчивости раковых клеток к проводимой терапии, её высокой токсичности для нормальных тканей, клеток и участием в прогрессии рака клеток опухолевого микроокружения [4, 5]. Указанные препятствия потребовали переосмысления существующих методов лечения и поиска новых терапевтических подходов для онкологических заболеваний.

Использование живых бактерий, селективно колонизирующих опухоль, представляет собой перспективное направление для терапии рака, которое позволяет преодолеть многие проблемы [6]. В отличие от большинства терапевтических средств, бактерии обладают многочисленными механизмами, направленными на ингибирование роста опухолей. Микроорганизмы селективно колонизируют опухоли и размножаются внутри них, где они инициируют противоопухолевые иммунные реакции, что, в итоге, увеличивает продолжительность жизни после системной инфекции в опухолевых моделях у животных [7]. Например, атенуированный более чем в 10 000 раз штамм *Salmonella typhimurium* VNP20009 в сравнении со штаммом дикого типа имеет соотношение колонизации опухоль : печень > 1000 : 1 и проявляет в титрах 1×10^4 – 3×10^6 cfu/мышь) сильное ингибирующее действие (57–95%) на рост Lox, DLD-1, A549, WiDr, НТВ177, MDA-MB-231 и B16F10 опухолей человека и развитие лёгочных метастазов в опухолевых моделях у мышей [8, 9]. Кроме того, такие бактерии можно дополнительно запрограммировать с помощью простых или сложных генетических и биоинженерных методов для синтеза и опухольселективной доставки противоопухолевых препаратов [10]. К примеру, использование бактерий в качестве транспортных векторов может увеличить слабое проникновение в опухоль и активность химиопрепаратов, одновременно снижая их системную токсичность для организма. Бактерии можно использовать для целенаправленной «доставки» к опухолям химиопрепаратов, цитокинов, иммуномодуляторов, ферментов, пролекарств или малых интерферирующих РНК [6]. Кроме того, сами бактерии могут синтезировать противоопухолевые ферменты, например L-аспарагиназу или метионин-гамма-лиазу [11, 12].

Подвижность является важным свойством и позволяет бактериям проникать глубже в опухолевую ткань. В отличие от пассивного распределения и ограниченного проникновения химиопрепаратов, бактерии являются сложными живыми организмами, которые могут получать энергию из окружающей среды и преобразовывать её в кинетическую энергию

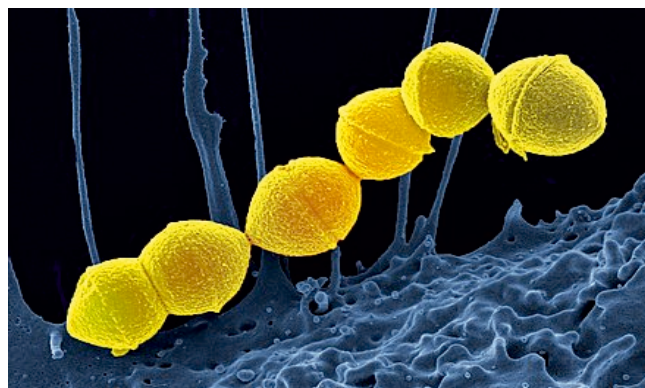


Рис. 1. Электронная микрофотография *S. pyogenes*.

Источник: Streptococcus pyogenes.

URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_pyogenes

движения, что позволяет им самостоятельно передвигаться вглубь новообразования [13]. Микроорганизмы способны влиять на микроокружение опухоли и продуцировать собственные онколитические метаболиты (пептиды, бактериоцины), что делает эти микробы привлекательным подходом для терапии рака [14]. Лечение с помощью живых бактерий может применяться как в качестве монотерапии, так и в сочетании с другими онкологическими методами. К онколитическим бактериям относятся *Bifidobacteria*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus bovis* и *S. pyogenes* (рис. 1) [14].

Поскольку *S. pyogenes* являются группой микроорганизмов, служащей причиной развития у человека частой патогенной формы стрептококковой инфекции группы А и одним из объектов, изучаемых в отделе молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, эти бактерии и были выбраны в качестве ключевого объекта для обсуждения в данном обзоре его противоопухолевых свойств.

Целью обзора явилось обсуждение механизмов противоопухолевого действия *S. pyogenes* и других видов стрептококков, а также рассмотрение их опухоль-стимулирующих эффектов и существующих при этом ограничений.

Противоопухолевые механизмы *Streptococcus pyogenes*

С 1891 г., когда доктор W. Coley впервые использовал вакцину на основе живых *S. pyogenes* и *Serratia marcescens* для лечения 10 пациентов с терминальной остеосаркомой и предположил связь между развитием лихорадки и уменьшением размеров опухоли [15], было изучено и отобрано несколько бактериальных штаммов для тестирования на пациентах. Для того чтобы понять патогенетические механизмы воздействия *S. pyogenes* на опухолевые клетки, необходимо рассмотреть ассоциированные факторы патогенности этих микроорганизмов.

Факторы патогенности

Для *S. pyogenes* обнаружено более 40 факторов патогенности [16]. Все они могут быть разделены на связанные с микробной клеткой и внеклеточные.

Клетка стрептококка окружена клеточной стенкой, образованной полимером пептидогликаном, состоящим из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты и ковалентно связанными с ними тейхоевыми и липотейхоевой кислотами [17]. С клеточной стенкой соединены белковые и полисахаридные компоненты (рис. 2) [18].

К полисахаридам клеточной стенки относятся также карбоксигидратные антигены, образованные группоспецифическим полисахаридом-A, различия структуры которого положены в основу классификации стрептококков [20]. Среди белков клеточной стенки основным фактором патогенности является M (Emm) белок, который обеспечивает устойчивость *S. pyogenes* к фагоцитозу и размножение в крови [21].

Авторами статьи показано, что как дикий *GUR*, так и мутантный по M-белку *GURSAI* штаммы (10^6 КУ/мл) оказывали *in vitro* цитотоксический эффект на клетки глиомы С6 с использованием системы xCELLigence (рис. 3) [22, 23].

Данные рис. 3 показывают, что штаммы стрептококков *GUR*, *GURSAI* продемонстрировали быстрое и сильное онколитическое действие в отношении клеток глиомы С6. Штаммы *GUR* и *GURSAI* *S. pyogenes* оказывали самые медленные цитотоксические эффекты на клетках глиомы С6 с самыми высокими показателями ингибирования клеток — 81,8 и 79,3% через 4 и 6 ч соответственно. Более того, цитотоксический эффект штаммов *GUR* и *GURSAI* *S. pyogenes* немного увеличивался с течением времени, достигая показателей инги-

бирования роста 85,0 и 81,5% соответственно через 8 ч [22]. Аналогичные результаты были получены при тестировании штаммов *GUR* и *GURSAI* *S. pyogenes* в реальном времени на клетках аденокарциномы поджелудочной железы (Panc) мыши (рис. 4) [23].

Результаты, представленные на рис. 3, 4, показывают, что оба штамма ингибировали рост клеток глиомы С6 и Panc, причём действие штамма *GURSAI* было несколько слабее, чем *GUR*, что подтверждает наличие цитотоксического эффекта, обусловленного наличием M-белка как фактора патогенности. Вместе с тем оба штамма не оказывали цитотоксических эффектов на клетки нормальных фибробластов в режиме реального времени (рис. 5) [23].

S. pyogenes синтезируют не один M-белок, а существуют по крайней мере до 4 групп M-белков: FG I (*Mrp*); FG II, M-белок и H-белок; FG III (*Enn*); и FG IV (M-белок). Белки M и Enn образуют 2 группы с 9 подгруппами, а белки Mrp — 4 группы с 10 подгруппами (рис. 6) [24].

Известно, что M-белки состоят из α -спиральных фибрилл диаметром 50–60 нм, расположенных на клеточной стенке бактерий. Эти протеины имеют суперспирализованную структуру и могут формировать димеры с разной длиной полипептидной цепи (рис. 7) [25].

M-белки, как факторы патогенности, способствуют устойчивости *S. pyogenes* к фагоцитозу макрофагами и воздействию антител организма-хозяина [26]. M-белки могут связывать протеины плазмы крови: иммуноглобулины G и A (Fc-фрагменты), фибриноген, фибронектин, альбумин, плазминоген, C4b-связывающий белок (C4BP), фактор-H и белки комплемента [19]. Взаимодействие M-белка с факторами плазмы влияет на адгезивные и инвазивные

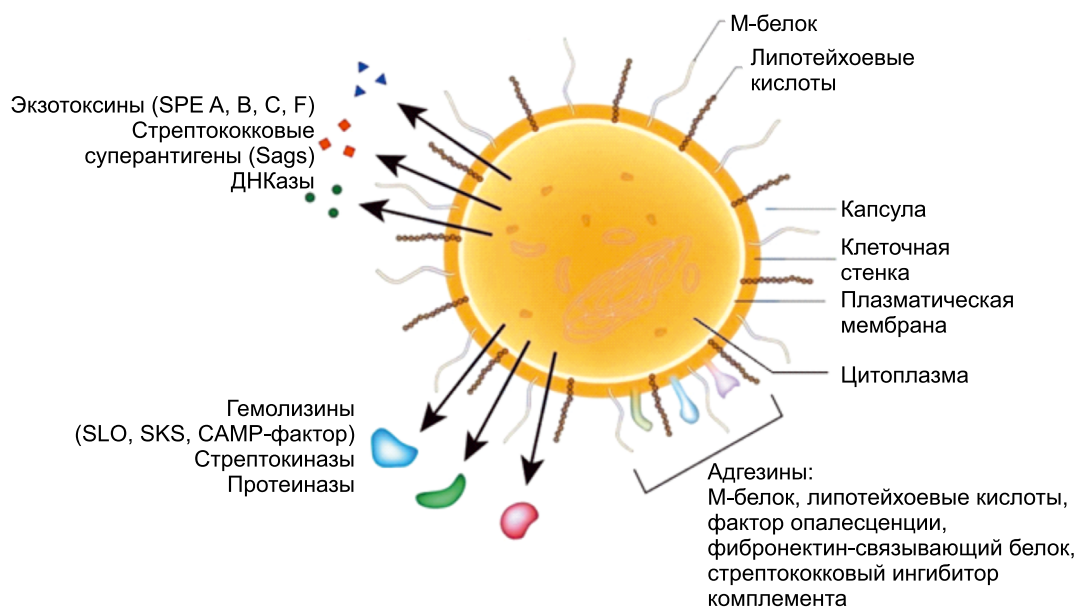


Рис. 2. Структура клетки стрептококка и основных биологически активных продуктов *S. pyogenes* [19].

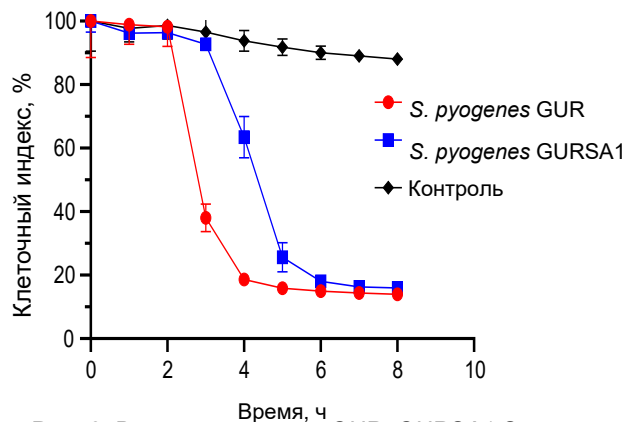


Рис. 3. Влияние штаммов *GUR*, *GURSA1 S. pyogenes* на клетки С6 в реальном времени по данным xCELLigence [24].

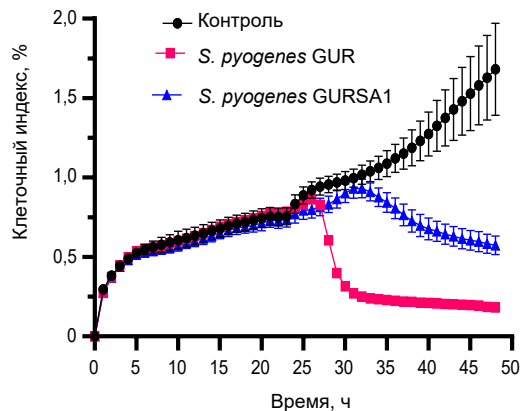


Рис. 4. Влияние штаммов *GUR*, *GURSA1 S. pyogenes* на клетки Ранс в реальном времени, по данным xCELLigence [23].

свойства *S. pyogenes*, а также через изменение коагуляционной способности крови опосредовано — на жизнеспособность раковых клеток. Это подтверждается тем, что состояние гиперкоагуляции крови, как компонента опухолевого микроокружения, способствует прогрессии опухолей [27].

Остальные факторы патогенности *S. pyogenes* изучены в меньшей степени. К ним относятся: экзотоксины стрептолизины S, O, суперантигены, сериновая и цистеиновая протеиназы, стрептокиназа, аргининдеимидаза, эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза, никотинамиддинуклеотидаза и др. [19]. Например, аргининдезаминаза (ADI) состоит из 2 доменов, первый из которых образован 5 участками ββαβ, повторяющимися вокруг псевдо-5-кратной оси, содержащей активный центр. Второй домен представляет 4-доменную спиральную цепь (рис. 8).

ADI впервые была выделена из штамма Su (3 мкг/мл), способного подавлять рост трансформированных клеток фибробластов BALB/3T3 [29]. ADI локализуется в клеточной стенке *S. pyogenes*, тогда как у *S. suis* этот же фермент присутствует в мембранной фракции клеток. Её активность свя-

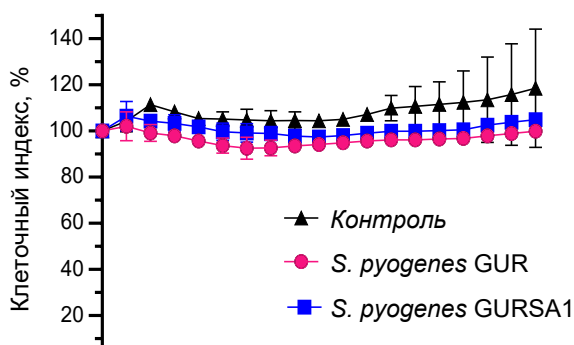


Рис. 5. Воздействие штаммов *GUR*, *GURSA1 S. pyogenes* на нормальные клетки фибробластов в реальном времени, по данным xCELLigence [23].

зана со способностью превращать аргинин в аммиак и цитруллин [30]. С другой стороны, утилизация аргинина усиливает пролиферацию и рост некоторых типов опухолей, например, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы и рака предстательной железы. Дефицит аргинина индуцирует остановку цикла в G₁-фазе раковых клеток, активацию в них генов mTOR- и GCN2-киназы, которые

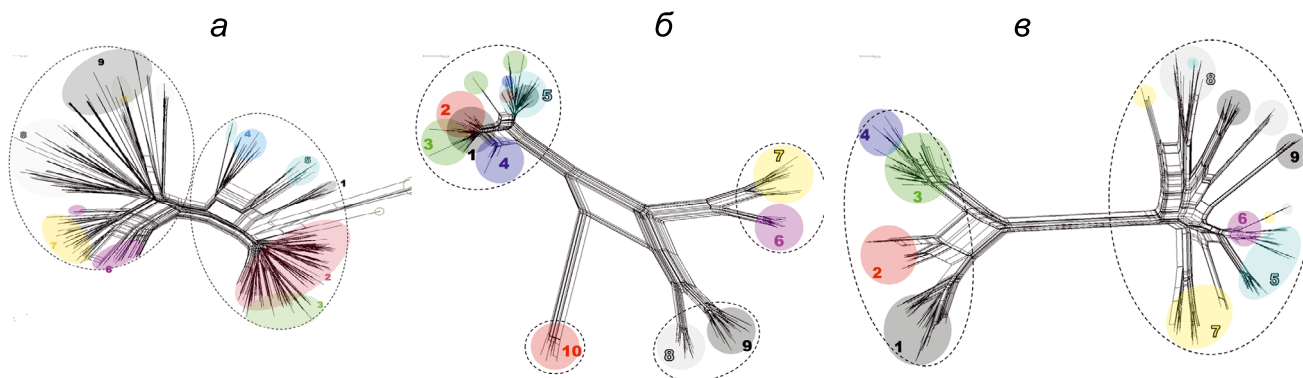


Рис. 6. Генетический сетевой анализ SplitsTree, включающий 537 генетических последовательностей с выделением кластеров М-белков [24].

а — М-белок; б — Mrp (221 последовательности); в — Epp белок (262 последовательности). Чёрные пунктирные эллипсы обозначают две группы М-белков, зеленые пунктирные эллипсы — химерные М-белки, а цветные эллипсы обозначают подгруппы М-белков.

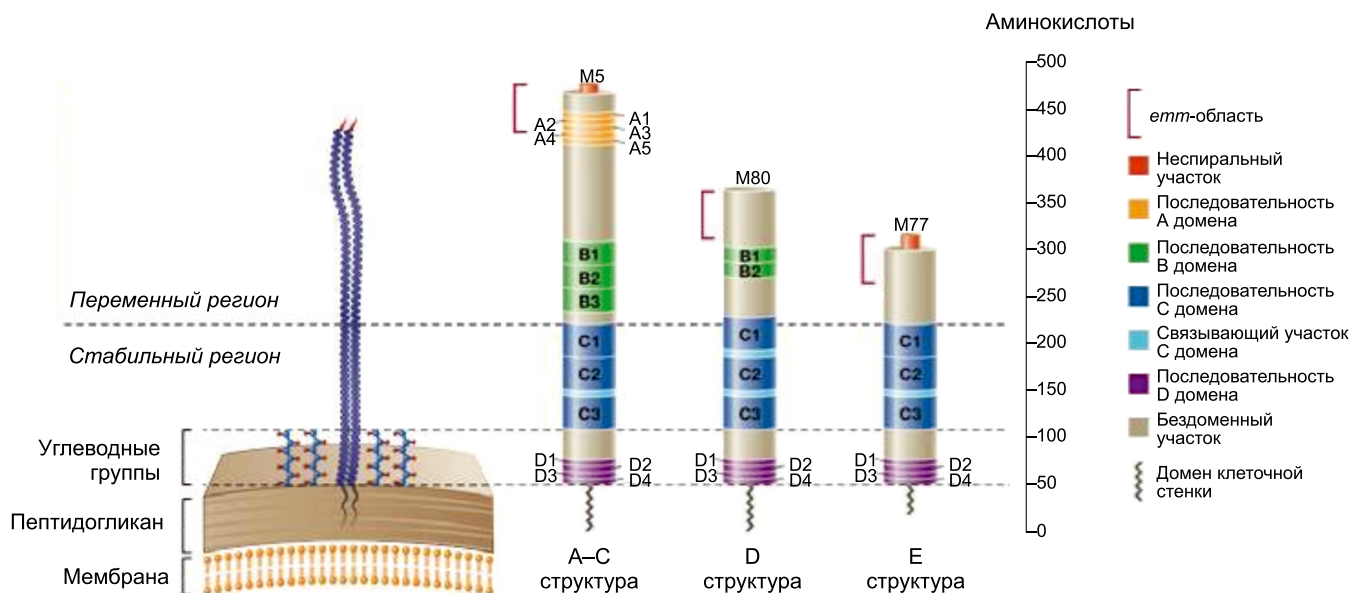


Рис. 7. Три М-белка (М5, М80 и М77) [25].

Длина белка М и размер повторяющихся и неповторяющихся доменов показаны в масштабе. Структуры А–С emm-типов представляют самые длинные М-белки с гиперварибельным доменом из 230 остатков. Белки D и E обладают гиперварибельным доменом из 150 и 100 остатков соответственно. Повторы «А» отсутствуют в подавляющем большинстве М-белков, имеющих D и E структуры. Повторы «В» присутствуют в большинстве А–С и D emm-типов, но отсутствуют в E-М-содержащих М-белках.

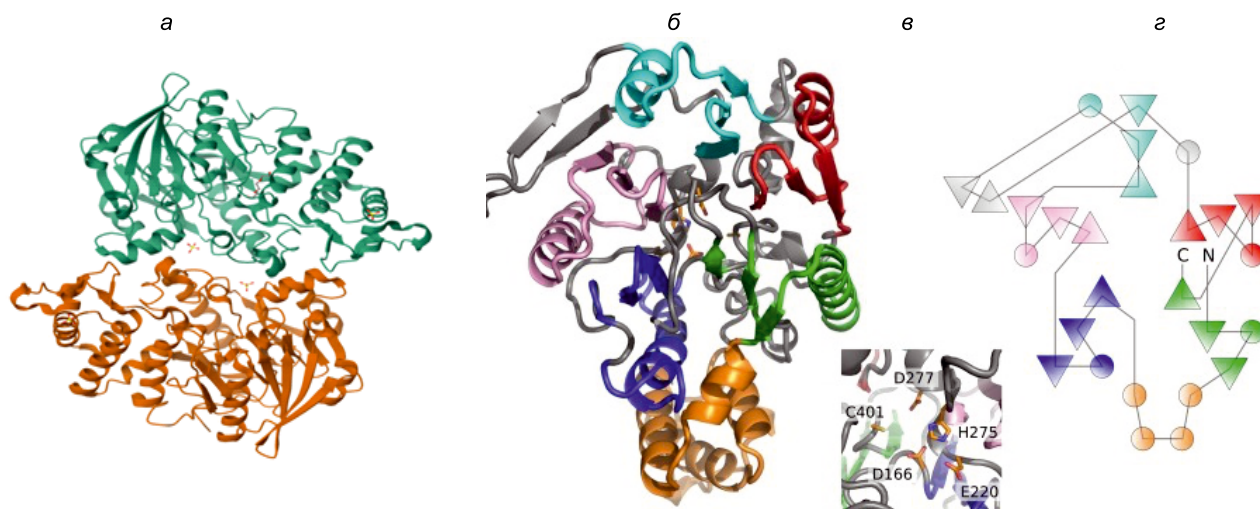


Рис. 8. Структура ADI *S. pyogenes* (а); кристаллическая структура из различных участков, обозначенных разными цветами (б); остатки активного центра ADI (в) и топологическая схема ADI (г) [28].

запускают аутофагию и апоптоз [31, 32]. Т. Fiedler и соавт. изучили эффективность терапии ADI (3,5–350,0 МЕД/мл) и её комбинаций с цитостатическими препаратами: хлорохином (5 и 20 мкМ), субериоланилидом гидроксамовой кислоты (SAHA; 0,25 и 0,5 мкМ) или паломидом 529 (двойной ингибитор TORC1/TORC2; 7,5 мкМ) для ингибирования роста 12 линий клеток глиобластомы (ГБМ) *in vitro* и *in vivo* на самцах NMRI Foxn1nu мышей массой 20–25 г [33]. Применение ADI ингибировало рост ГБМ в 50% протестированных линий (рис. 9).

На клеточных линиях, для которых ADI снижала пролиферацию клеток, были протестированы

её комбинации с химиопрепаратами. На клетках HROG02, HROG05 и HROG10 66% ГБМ наблюдались синергические эффекты с ингибированием роста до 70% при использовании комбинации ADI с Palomid 529. Аналогичные противоопухолевые эффекты (гибель клеток на 60%) были установлены после добавления хлорохина к ADI. Причиной противоопухолевых эффектов ADI было эпигенетическое подавление генов пути синтеза аргинина (аргининосукцинатсинтетазы *ASS1* и аргининосукцинатлиазы *ASL*). На модели *in vivo* ADI (250 ЕД/кг массы) и его комбинация с SAHA (25 мг/кг массы) ингибировали на 70% размеры

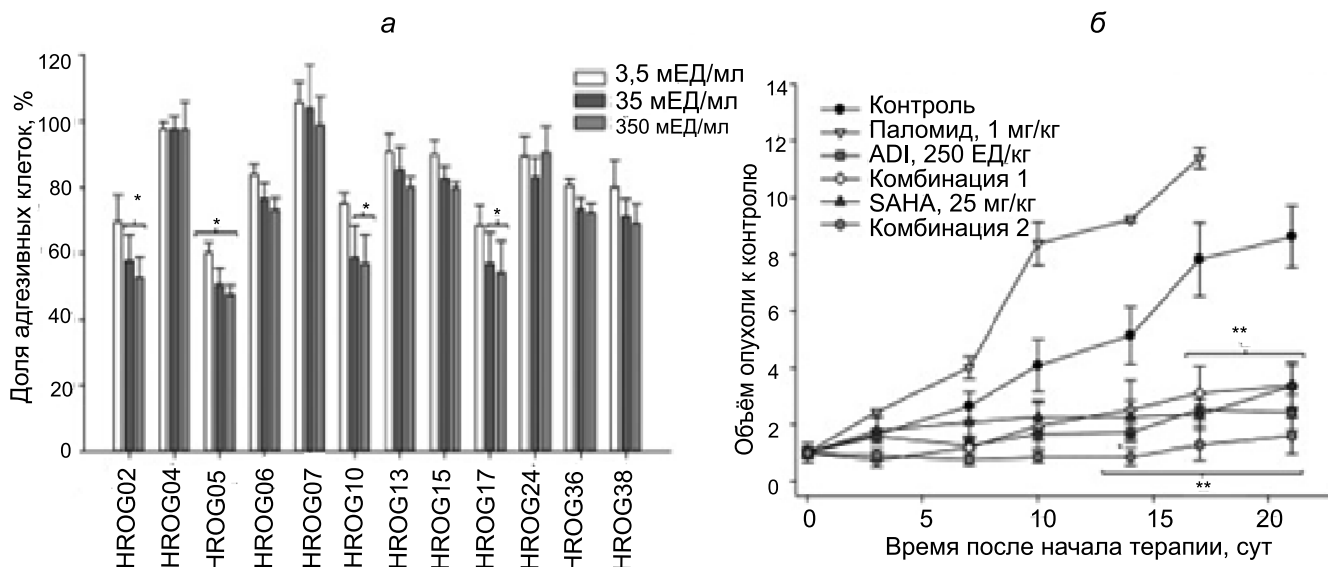


Рис. 9. Окрашивание кристаллическим фиолетовым клеток ГБМ после 72 ч инкубации с ADI (а) и кривая роста опухоли (б).

Объёмы опухолей даны как x -кратное увеличение по сравнению с 0 днем [33].

опухоли гетеротрансплантата HROG05 по сравнению с контролем (рис. 9, б) [32].

С. Maletzki и соавт. обнаружили, что ADI (35 МЕД/мл) индуцировала экспрессию генов теплового шока и метаболизма аргинина (ASS1, ASL, ArgI, CPSI, OTC) в клетках HROG02, HROG05, HROG52, HROG63 ГБМ пациентов (рис. 10) [34]. Как в предыдущей работе, применение ADI стимулировало аутофагию и старение опухолевых клеток. Комбинации ADI с куркумином, ресвератролом, хинакрином и сорафенибом в течение 3 сут усиливали цитотоксичность фермента за счёт активации аутофагии.

К другим факторам патогенности *S. pyogenes* относятся холестеринзависимые цитолизины и стрептолизин О (SLO). S.C. Feil и соавт. определили трёхмерную структуру этого фермента (рис. 11) [35]. Молекула SLO состоит из 571 аминокислоты и образует 4 домена, имеющие β -складчатую структуру. Первый N-концевой домен (70 аминокислот) отщепляется в результате протеолиза стрептококковыми протеазами после секреции. Помимо доменов, SLO содержит 2 трансмембранные области TMH1 (остатки 259–288) и TMH2 (остатки 359–386), имеющие α -спиральную структуру. SLO также включает 11-аминокислотную последовательность ECTGLAWEWWR, богатую остатками триптофана, которая способствует встраиванию молекулы в мембраны клеток [35]. В результате олиго- и полимеризации SLO формируют крупные поры в клеточных мембранах. Эти механизмы приводят к структурному повреждению, сильному истощению АТФ и гибели клеток по типу некроза. Следовательно, данный механизм действия SLO можно использовать для цитолиза опухолевых клеток.

В этой связи С. Gruber и соавт. с помощью трансплайсинга РНК разработали 3'-пре-транс-сплайсинговые молекулы (PTM), содержащие встроенный ген *SLO* в целевом гене матричной металлопротеиназы-9 (*MMP9*) в клетках высокоагрессивной плоскоклеточной карциномы [38]. Данная технология позволила заменить опухоль-специфичный транскрипт на кодирующий пептид/токсин, что привело к гибели клеток. Для визуализации транскрипта использовалась флуоресцентная метка (рис. 12).

Трансплайсинг между 50-м и 30-м нуклеотидами генов *MMP9* и *PTM* привёл к образованию мРНК, кодирующей полноразмерный GFP-белок, содержащий DsRed-метку. Трансфекция раковых клеток плоскоклеточной карциномы и эмбриональных почек человека HEK293 с помощью SLO-PTM индуцировала в них гибель за счёт экспрессии SLO (рис. 13). Таким образом, использование SLO является новым подходом в бактериальной терапии злокачественных опухолей человека [35].

У других видов стрептококков *S. bovis*, например, принадлежащих к группе D, обнаружен бактериоцин бовидин HC5, синтезируемый в рибосомах [37]. Этот катионный пептид оказывает цитолитическое действие против клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и гепатоклеточной карциномы HepG2 [38].

Опосредованные механизмы противоопухолевого действия *S. pyogenes*

Помимо прямого цитолитического действия на опухолевые клетки, *S. pyogenes* в организме могут оказывать и опосредованные иммунными клетками и факторами цитостатические противоопухолевые эффекты. Проникая в организм, стрептококки вос-

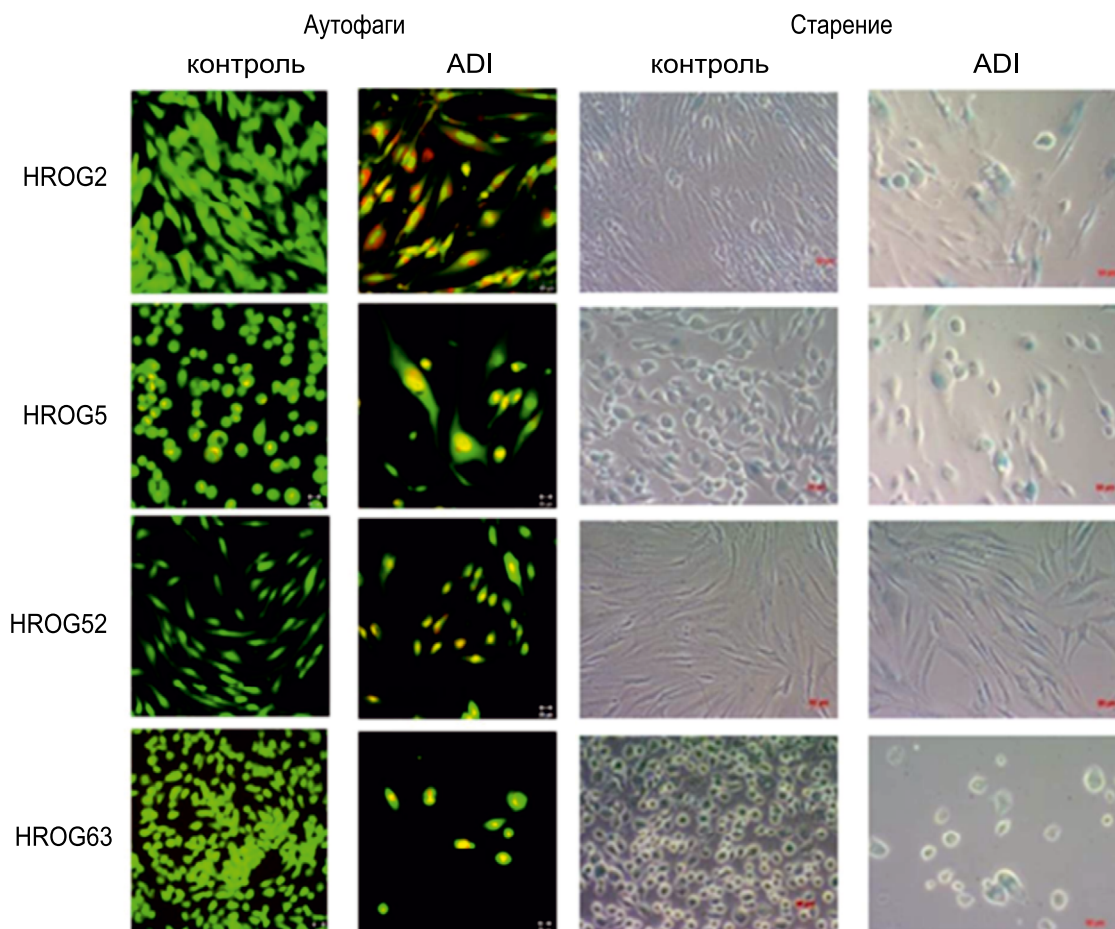


Рис. 10. Воздействие ADI индуцирует аутофагию и старение в клетках ГБМ [34].

Окрашивание акридином оранжевым (оранжевый) и кальцеином AM (зелёный). Анализ проведён на лазерном сканирующем микроскопе «Zeiss» с использованием 20-кратных объективов.

принимаются иммунной системой как «чужеродные» и запускают воспалительную реакцию. В ходе этой реакции развивается «цитокиновый и хемокиновый шторм», обусловленный повышением уровня фактора опухоли- α (TNF- α), интерферона- γ , интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-10), интерлейкина-1, TNFR1, TNFR2 [40]. Помимо этих изменений, Y.H. Liu и соавт. обнаружили, что во время инфекции штаммом A20 *S. pyogenes* клетки мозга пациента экспрессировали на высоком уровне глиальный фибриллярный кислый белок, индуцибельную синтазу оксида азота, компоненты оксидазы никотинадениндинуклеотидфосфата, что стимулировало продукцию реактивных форм кислорода. В коре и гиппокампе инфицированных мышей также экспрессировалась миелопероксидаза, секретлируемая активированными макрофагами и нейтрофилами (рис. 14) [39].

Повышение уровней IL-10 и IL-12 в крови активирует CD18⁺-моноциты и CD11c⁺CD123⁺-плазмоцитодендритные клетки (ДК) через сигнальный путь Toll-подобного рецептора (TLR) [40]. T.G. Loof и со-

авт. показали, что при стимуляции KTL3 штаммом *S. pyogenes* через активацию TLR4 в MyD88-ДК в них снижалась экспрессия костимулирующих молекул CD40, CD80, CD86 и продукция воспалительных цитокинов [41, 42]. Активация рецепторов

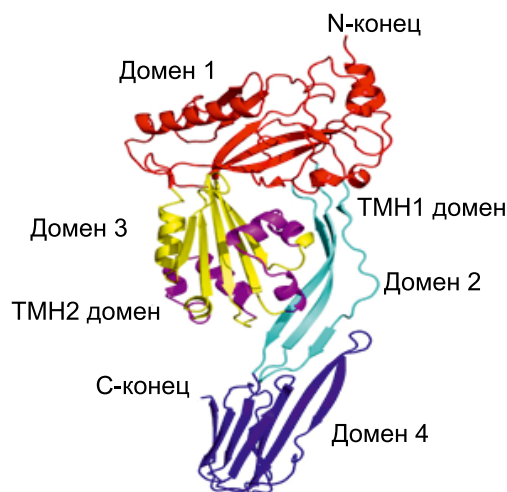


Рис. 11. Молекулярная структура SLO [35].

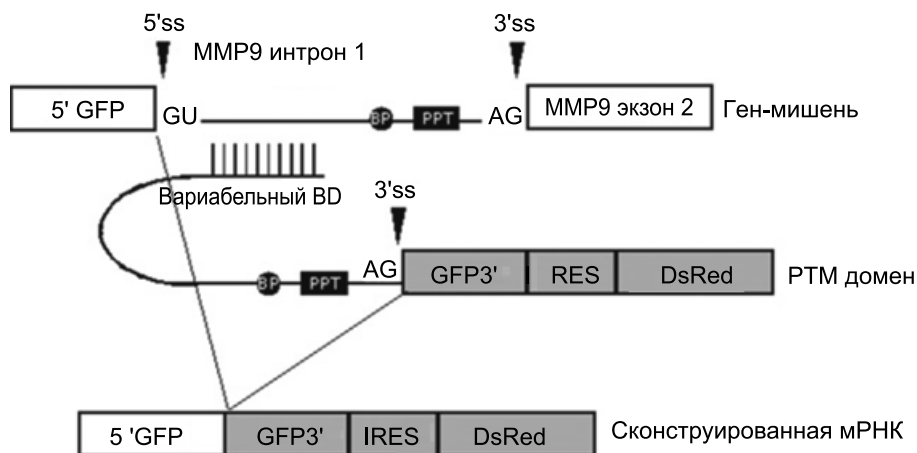


Рис. 12. Диаграмма флуоресцентной транссплайсинговой тестовой системы [36].

PTM — сконструированная мРНК, связанная через антисмысловой BD домен с интроном 1 гена *MMP*; BP — точка ветвления; PPT — полипиримидиновая последовательность.

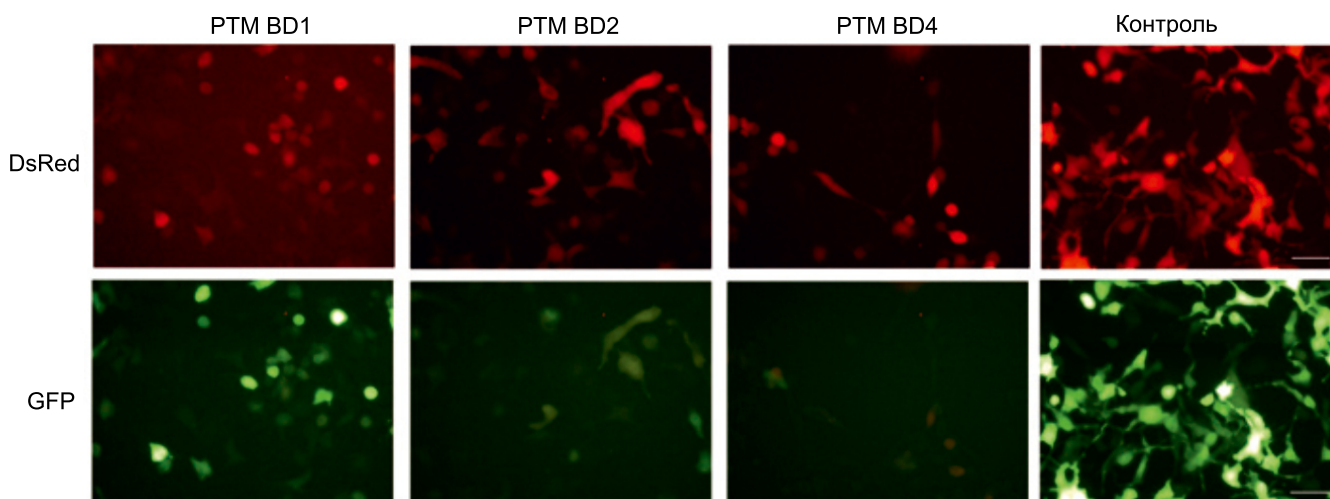


Рис. 13. Флуоресцентная микроскопия трансфицированных клеток HEK293 [36].

Контроль трансфицирован конструкцией, содержащей метку DsRed и полноразмерный кДНК GFP. Клетки, экспрессирующие GFP, указывают на транс-сплайсинг целевого гена и PTM, содержащего один из трех BD (BD1, BD2 и BD4) доменов. Масштаб 20 мкм.

и CD54, CD70, CD83, CCR7 молекул запускает в ДК p38MAPK, ERK, JNK, PI3K/Akt/NF-κB сигнальные каскады, которые усиливают их пролиферацию и дифференцировку [43, 44]. Недавно X. Chen и соавт. установили, что TLR4 также стимулирует cGAS-STING/NF-κB-сигнальный путь, который опосредует созревание ДК и секрецию IL-6 [45]. Эти результаты показывают, что *S. pyogenes* через стимуляцию моноцитов, макрофагов, могут проявлять свои противоопухолевые эффекты.

Кроме того, *S. pyogenes* стимулируют субпопуляцию интерферон-продуцирующих ДК и естественных киллеров. Активация этих клеток усиливает процессинг, презентацию опухолевых антигенов, TNF-α-индуцирующий TRAIL- и Fas-лиганд-зависимый апоптоз [46]. В свою очередь, плазмоцитоидные миеоидные ДК активируют опухольспецифичные цитотоксические CD8⁺,

CD4⁺-Т-лимфоциты и секрецию ими цитокинов [40, 47]. Согласно работе W. Li и соавт. факторы, участвующие в активации ДК при гепатоцеллюлярной карциноме, представлены на **рис. 15**.

Ключевой фактор патогенности — кислый гликопротеин стрептококков (SAGP) связывается со IAP-сопряжённым рецептором, что активирует протеинтирозинфосфатазу, которая дефосфорилирует эпидермальный фактор роста и блокируют p42/44MAPK-сигнальный каскад, ингибируя тем самым пролиферацию опухолевых клеток A431 эпидермоидной карциномы [48]. *S. pyogenes* секретируют экзотоксины SpeB, SpeA, обладающие цистеин-протеазной активностью и инактивирующие факторы воспаления IL-8, C5a, кателицидин LL-37, а также ингибируют хемотаксис нейтрофилов [26, 47, 49, 50]. ДНКазы SpnA и SdaI *S. pyogenes* подавляют образование внеклеточных ловушек ней-

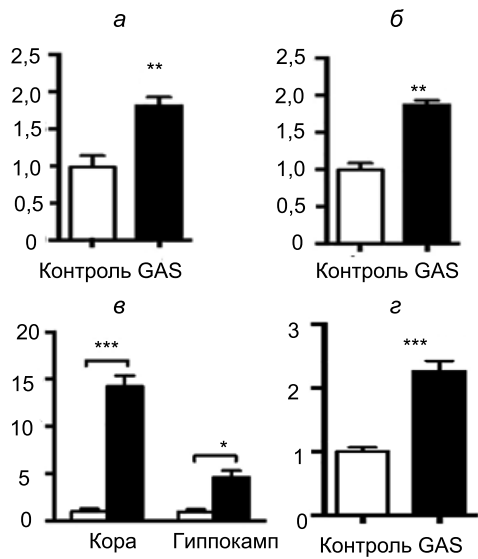


Рис. 14. Изменение уровней (разы) глиального фибриллярного кислого белка (а), индуцибельной синтазы оксида азота (б), миелопероксидазы (в) и MMP-9 (г) в мозге при инфекции штаммом A20 *S. pyogenes* у пациента [39].

трофилов, SpeV супрессируют активность анти-микробных хемокинов (рис. 16). Кроме того, SpeV способствуют образованию газдермина D, формирующего поры и индуцирующего пироптоз, а также ингибирующего IL-1 β и Н-кининоген, которые оказывают мощное провоспалительное действие [47]. Следовательно, секреция экзотоксинов стрептококками может ингибировать рост и развитие опухоли.

Цитотоксической активностью обладают не только живые стрептококки, но и полученный на их основе препарат ОК-432 (пицибанил, NSC-B116209; рис. 16), введение которого (0,001–1,0 мкг/мл) вызвало активацию CD56⁺НК. Это приводило к замедлению роста на 7–14 сут карциномы молочной железы MADB106 на внутрибрюшинной модели у F344 крыс [51]. Применение ОК-432 способствовало активации Т-хелперных лимфоцитов и лейкоцитов за счёт увеличения количества нейтрофилов [26]. В обзоре Y. Yuома и соавт. суммируют механизмы противоопухолевой активности ОК-432, показывая, что пицибанил индуцирует прямое противоопухолевое действие за счёт ингибирования

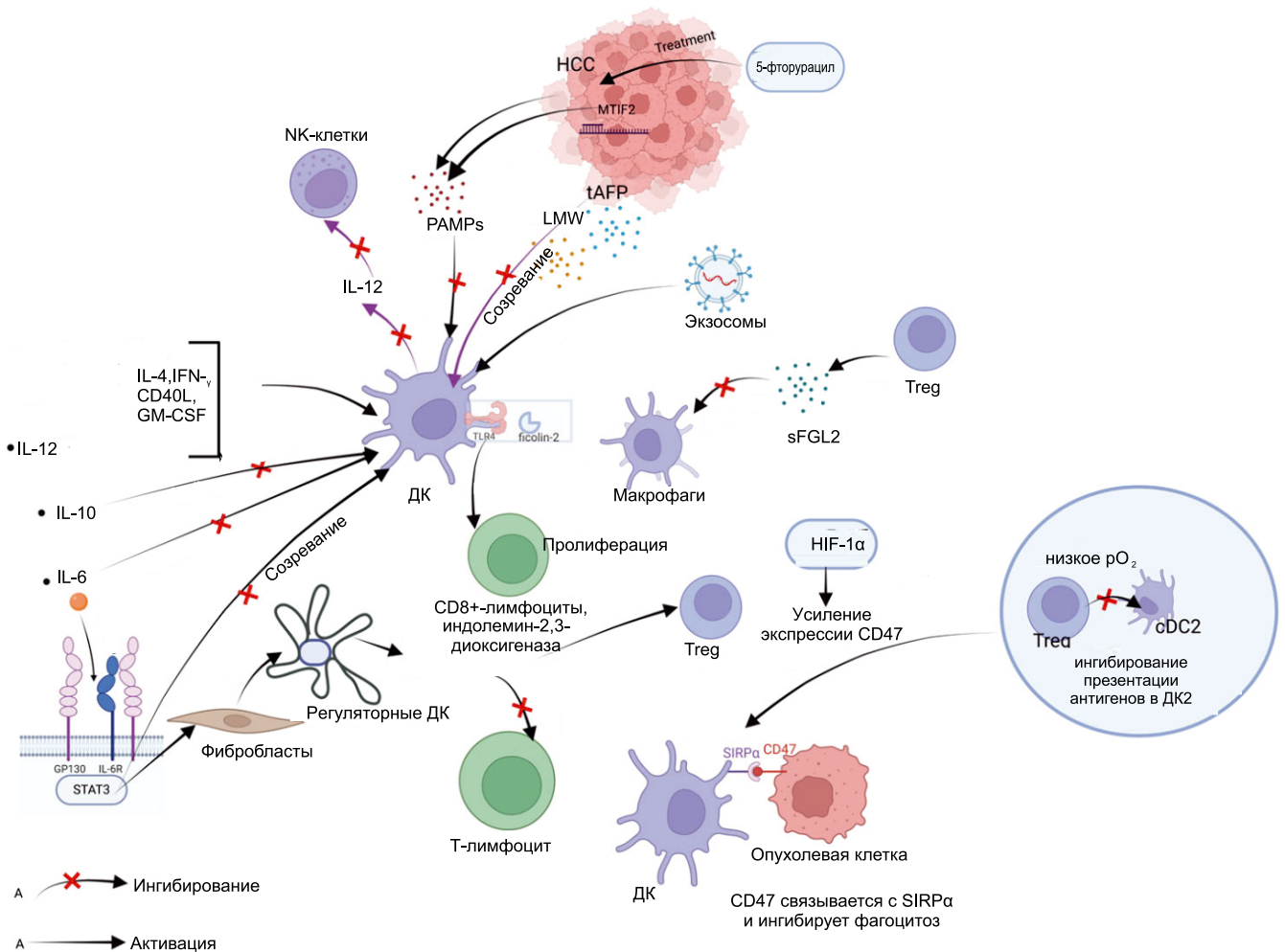


Рис. 15. Механизмы активации стрептококками ДК, нацеленных на ингибирование роста гепатоцеллюлярной карциномы [47].

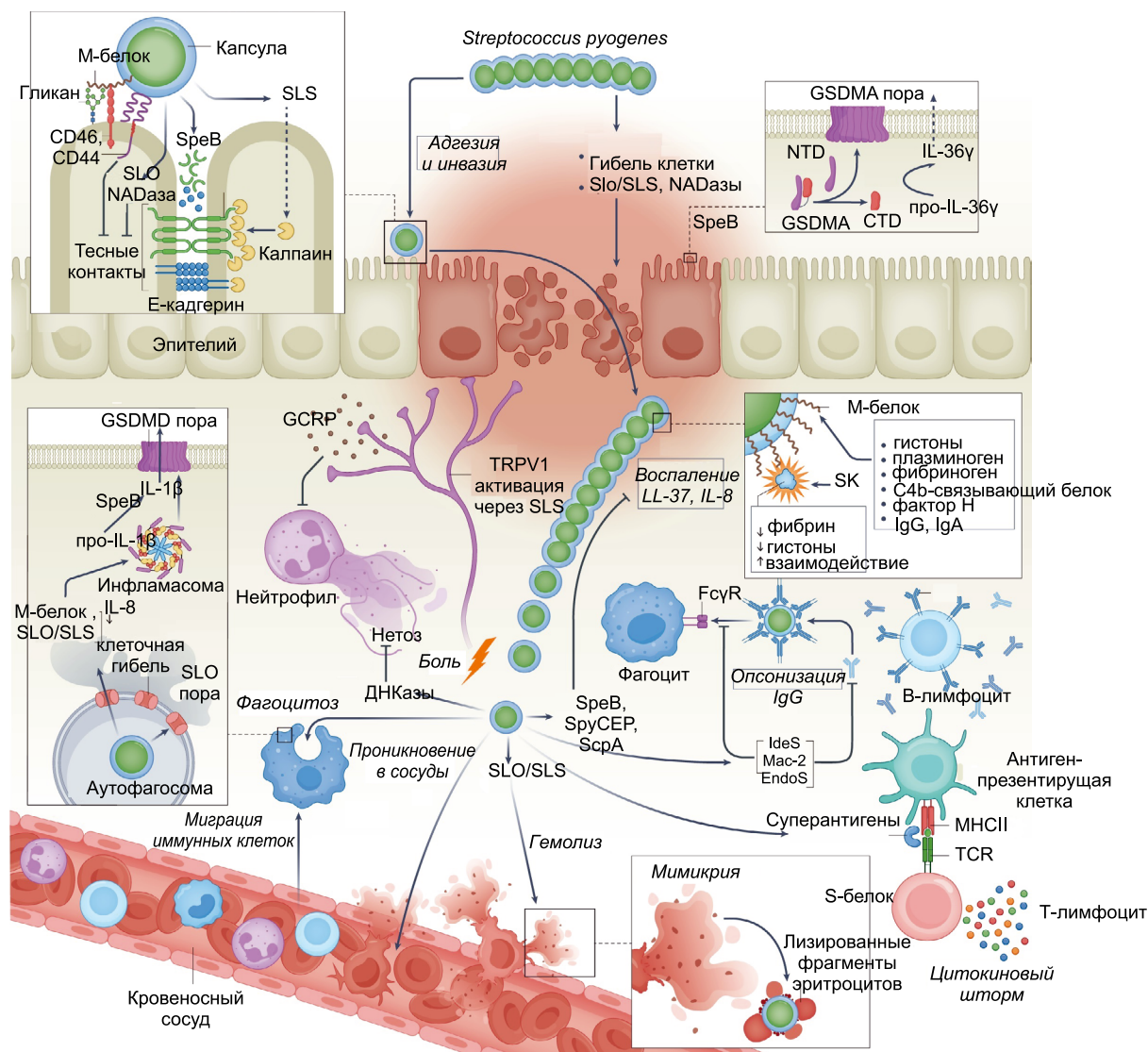


Рис. 16. Молекулярные и клеточные механизмы патогенеза *S. pyogenes* [26].

ния синтеза РНК и остановки клеточного цикла. Также ОК-432 стимулирует синтез TNF- α , перфорина и интерферона- γ , которые активируют экспрессию молекул межклеточной адгезии (ICAM-1), HLA-DR и, в итоге, апоптоз раковых клеток [52]. ОК-432 стимулирует продукцию IL-8, макрофагальных факторов (G-CSF, GM-CSF), которые усиливают пролиферацию и созревание гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов и тромбоцитов [52]. Результаты последнего времени убедительно показывают, что коллаген-подобный белок-1 (Sc11) *S. pyogenes* ингибирует образование внеклеточных ловушек нейтрофилов на модели крыс с Panc02 аденокарциномой протока поджелудочной железы [53].

В этой связи интересно заметить, что стрептококки могут инфицировать опухоль, образуя на ней биоплёнки. Стрептококковая инфекция активирует иммунную систему организма, что увеличивает количество нейтрофилов и лимфоцитов в очаге инфекции [14, 54]. Таким образом, бакте-

риальные компоненты могут усиливать взаимодействие между опухолью и иммунной системой, действуя как адьюванты, способствуя презентации опухолевых антигенов и активации иммунной системы [55].

Доклинические и клинические исследования

Результаты проведённых экспериментов *in vitro* и *in vivo* с участием *S. pyogenes*, установивших их противоопухолевые эффекты и механизмы, стимулировали дальнейшее проведение доклинических и клинических испытаний с участием этих микроорганизмов.

Например, недавно Т. Iwai и соавт. провели доклиническое исследование по оценке эффективности внутриопухолевого введения ОК-432 или её комбинации с радиочастотной абляцией на 4–5-недельных самцах Sprague-Dawley крыс ($n = 145$; 80–90 г) с метастатической остеосаркомой [55]. Животные были разделены на 4 группы для оценки

общей выживаемости и размера опухоли: контрольная (без лечения), радиочастотная абляция, ОК-432 и RFA + ОК-432. Медиана выживаемости крыс в контрольной группе составила 28,4 сут (11–51 сут) и 38,4 сут (10–51 сут) в группах ОК-432, 40,0 сут (12–51 сут; $p = 0,14$) в РЧА и 47,3 сут (15–51 сут; $p = 0,084$) в РЧА + ОК-432 ($p = 0,046$) [56].

Японские учёные M.S. Оба и соавт. провели метаанализ, включающий 14 исследований с участием 796 пациентов, страдающих раком желудка III или IV стадии, после его хирургической резекции для оценки эффективности иммунотерапии ОК-432 по сравнению со стандартной химиотерапией. Первичной конечной точкой была общая выживаемость [57]. В группы контроля и ОК-432 вошли 726 и 796 пациентов соответственно. Медиана общей выживаемости составила 42,6 мес для группы ОК-432 и 32,3 мес для контрольной группы. Общее отношение рисков составило 0,88 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,77–1,00; $p = 0,050$; **рис. 17**) [57]. Авторы делают вывод о том, что иммунотерапия с использованием ОК-432 может быть эффективной для пациентов с раком желудка на III или IV стадиях после хирургического вмешательства [57].

Следует отметить, что при клиническом использовании ОК-432 наблюдались такие побочные реакции лёгкой степени, как усталость, анорексия, локальное воспаление, гиперемия, боль в груди и животе. Наиболее частым симптомом была лихорадка, контролируемая с помощью жаропонижающей терапии. Редко регистрировалось внутричерепное давление. Только у нескольких пациентов были отмечены смертельные исходы в связи с развитием эмболии, острого нефрита, кровотечения и неправильно дозированных инъекций препарата [58]. Серьёзные побочные эффекты требуют выявления их причин и связи с проводимой терапией, возмож-

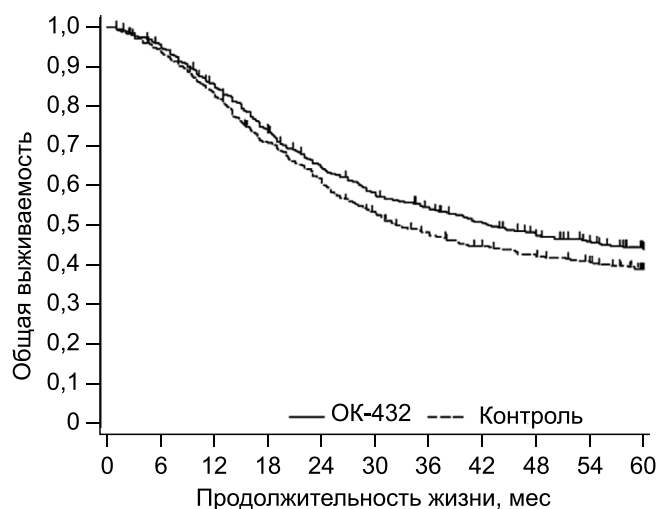


Рис. 17. Общая выживаемость пациентов с раком желудка, получавших иммунотерапию ОК-432 [57].

но, они были обусловлены некорректной дозой или развитием индивидуальной непереносимости препарата.

Механизмы опухоль-стимулирующих эффектов *S. pyogenes*

В процессе изучения противоопухолевого действия *S. pyogenes* постепенно накапливались данные и противоположного характера. Например, D. Kong и соавт. при изучении эффектов препарата ОК-432 (сапилин) у пациентов с раком молочной железы обнаружили усиление секреции цитокинов IL-1a, IL-6, факторов роста фибробластов- β , эндотелия сосудов и трансформирующего фактора роста- β 1 в дренажных жидкостях. Кроме того, применение этого препарата усиливало пролиферацию, миграцию и ангиогенез эпителиальных клеток HUVEC, HFL1, фибробластов и отложение коллагена [59]. Эти результаты показывают, что *S. pyogenes* через активацию пролиферации, миграции и ангиогенеза эпителиальных клеток и фибробластов могут стимулировать развитие рака молочной железы. Экзотоксины SpnA, SpeB и сериновая протеаза SpuSEP *S. pyogenes* участвуют в деградации IL-8, IL-1 β , фактора комплемента C5a, которые ингибируют миграцию (хемотаксис) нейтрофилов (**рис. 18**). В свою очередь, SpeB индуцирует протеолиз IgG, деградацию антимикробных пептидов, хемокинов, что способствует образованию внеклеточных ловушек нейтрофилов и развитию рака [60].

НАДаза S5nA подавляет фагоцитарную активность макрофагов в отношении опухолевых клеток, а также ингибирует протеолиз IgG и антитело-опосредованное уничтожение нейтрофилами (опсонифагоцитоз) раковых клеток. Пептидазы EndoS/S2, IdeS/Mac-1 и Mac-2, SpeB участвуют в гидролизе гликанов и убиквитин-связывающих белков, ингибирующих апоптоз, а M-белок (SAGP) подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов [60]. Все эти события опосредованно стимулируют клеточный цикл, усиливают пролиферацию, миграцию опухолевых клеток, наблюдающихся преимущественно при хронической стрептококковой инфекции у онкологических пациентов.

Заключение

Вопреки устоявшимся взглядам, стрептококковая инфекция или лихорадка не всегда может быть нежелательной у онкологических пациентов и не всегда приводит к снижению резервов иммунной системы в организме онкологического пациента. Представленные в этом обзоре научные данные убедительно показывают, что *S. pyogenes* могут при участии факторов патогенности непосредственно оказывать противоопухолевое действие на раковые клетки. Кроме того, эти бактерии стимулируют интерлейкины, хемокины клеток иммунной системы

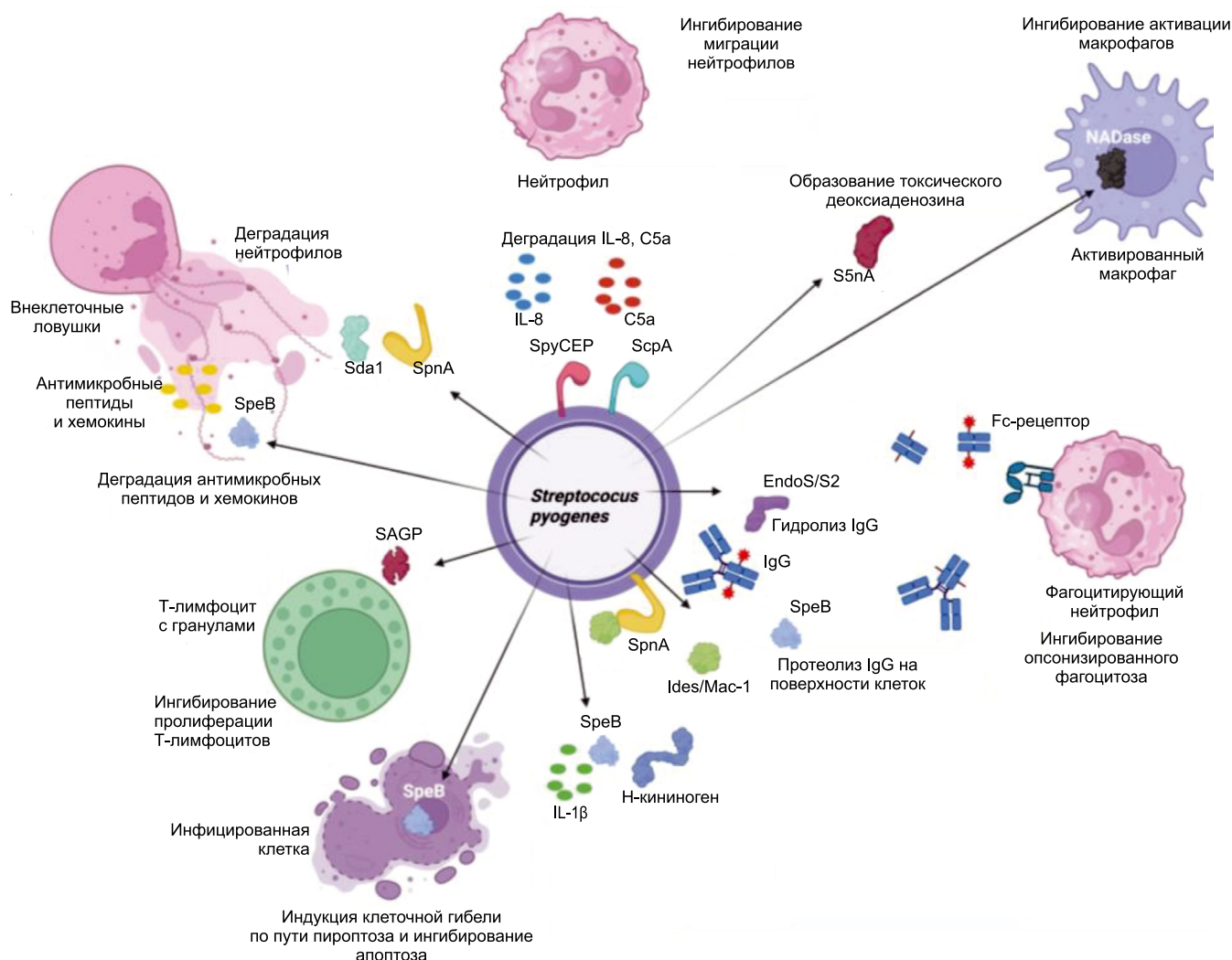


Рис. 18. Обобщающая схема воздействия *S. pyogenes* на иммунные клетки [60].

организма-хозяина (нейтрофилы, Т-, В-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки), которые, в свою очередь, участвуют в противоопухолевых иммунных реакциях.

Современные методы терапии опухолевых заболеваний (химиотерапия, лучевая терапия) имеют ряд недостатков, связанных с неселективностью действия на раковые клетки, а также, в силу клеточной и молекулярно-генетической гетерогенности опухоли, развитием терапевтической резистентности, что приводит к невозможности мониторинга эффективности лечения в динамике. Все эти проблемы обуславливают высокую онкологическую заболеваемость и смертность, прогрессию онкологических заболеваний с появлением более резистентных форм опухолей с высокой скоростью метастазирования.

Таким образом, необходимо совершенствование режимов терапии онкологических заболеваний с использованием новых подходов, включающих селективное противоопухолевое действие в соче-

тании с минимальной токсичностью в отношении нормальных тканей организма, а также способностью преодолевать постоянные динамические молекулярно-генетические изменения неопластических клеток. Всем этим критериям соответствует использование *S. pyogenes* в качестве терапевтической стратегии у онкологических пациентов. Однако следует отметить, что стрептококковую вакцину следует применять с осторожностью, учитывая индивидуальные особенности иммунной системы пациента, поскольку *S. pyogenes* могут оказывать и эффекты противоположного характера, требующие дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Global Burden of Disease Study Collaborators. JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-48. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>

2. Lee Y.T., Tan Y.J., Oon C.E. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* 2018;834:188–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
3. Kennedy L.B., Salama A.K.S. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J. Clin.* 2020;70(2):86–104. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21596>
4. Zhang S., Xiao X., Yi Y., et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Sig. Transduct. Target Ther.* 2024;9(1):149. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01848-7>
5. Wang Q., Shao X., Zhang Y., et al. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med.* 2023;12(10):11149–65. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>
6. Duong M.T.Q., Qin Y., You S.H., et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* 2019; 51(12):1–15. DOI: <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0297-0>
7. Fan J.Y., Huang Y., Li Y., et al. Bacteria in cancer therapy: a new generation of weapons. *Cancer Med.* 2022;11(23):4457–68. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.4799>
8. Clairmont C., Lee K.C., Pike J., et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* 2000;181(6):1996–2002. DOI: <https://doi.org/10.1086/315497>
9. Luo X., Li Z., Lin S., et al. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol. Res.* 2001;12(11-12):501–8. DOI: <https://doi.org/10.3727/096504001108747512>
10. Allemailem K.S. Innovative approaches of engineering tumor-targeting bacteria with different therapeutic payloads to fight cancer: a smart strategy of disease management. *Int. J. Nanomedicine.* 2021;16:8159–84. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S338272>
11. Alrumman S.A., Mostafa Y.S., Al-Izran K.A., et al. Production and anticancer activity of an L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):3756. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x>
12. Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu., Davydov D.Zh., et al. Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts. *Invest. New Drugs.* 2019;37(2):201–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0619-4>
13. Toley B.J., Forbes N.S. Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Integr. Biol. (Camb.)*. 2011;4(2):165–76. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2ib00091a>
14. Yarahmadi A., Zare M., Aghayari M., et al. Therapeutic bacteria and viruses to combat cancer: double-edged sword in cancer therapy: new insights for future. *Cell Commun. Signal.* 2024;22(1):239. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01622-w>
15. Coley W. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 1893;105(6):487–511.
16. Ferretti J.J., McScan W.M., Ajdic D., et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(8):4658–63. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.071559398>
17. Nakata M., Kreikemeyer B. Genetics, structure, and function of group A streptococcal pili. *Front. Microbiol.* 2021;12:616508. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616508>
18. Ward I.B. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly and location. *Microb. Rev.* 1981;45(2):211–43. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.45.2.211-243.1981>
19. Бурова Л.А., Тотолян А.А. Основные факторы патогенности *Streptococcus pyogenes*. *Инфекция и иммунитет.* 2022;12(1):33–50. Бурова Л.А., Тотолян А.А. Major pathogenicity factors of *Streptococcus pyogenes*. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2022;12(1):33–50. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MPF-1723>
20. Lancefield R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933;57(4):571–95. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571>
21. Ferretti J.J., Stevens D.L. Fischetti V.A., eds. M protein and other surface proteins on Streptococci. In: *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City;2016.
22. Chernov A.N., Tsapieva A.N., Alaverdian D.A., et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic effect of *Streptococcus pyogenes* strains, protegrin PG-1, cathelicidin LL-37, nerve growth factor and chemotherapy on the C6 glioma cell line. *Molecules.* 2022;27(2):569. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27020569>
23. Tsapieva A.N., Chernov A.N., Duplik N.V., et al. Studying the oncolytic activity of *Streptococcus pyogenes* strains against hepatoma, glioma, and pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *Microorganisms.* 2025;13(1):76. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010076>
24. Frost H.R., Guglielmini J., Duchêne S., et al. Promiscuous evolution of Group A Streptococcal M and M-like proteins. *Microbiology (Reading)*. 2023;169(1):001280. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001280>
25. McMillan D.J., Drèze P.A., Vu T., et al. Updated model of Group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19(5):E222–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12134>
26. Brouwer S., Rivera-Hernandez T., Curren B.F., et al. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A Streptococcus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023;21(7):431–47. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00865-7>
27. Zhang Y., Zeng J., Bao S., et al. Cancer progression and tumor hypercoagulability: a platelet perspective. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2024;57(6):959–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11239-024-02993-0>
28. Henningham A., Ericsson D.J., Langer K., et al. Structure-informed design of an enzymatically inactive vaccine component for Group A Streptococcus. *mBio.* 2013;4(4):e00509-13. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00509-13>
29. Yoshida J., Takamura S., Suzuki S. Cell growth inhibitory action of SAGP, an antitumor glycoprotein from *Streptococcus pyogenes* (Su strain). *Jpn. J. Pharmacol.* 1987;5(2):143–7. DOI: <https://doi.org/10.1254/jjp.45.143>
30. Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А. и др. Роль аргининдеиминазы пиогенного стрептококка в подавлении синтеза монооксида азота (NO) макрофагами. *Инфекция и иммунитет.* 2018;8(2):211–8. Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., et al. The role of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* in inhibition macrophages nitrogen monoxide (NO) synthesis. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2018;8(2):211–8. EDN: <https://elibrary.ru/rufnrr> DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-211-218>
31. Albaugh V.L., Pinzon-Guzman C., Barbul A. Arginine metabolism and cancer. *J. Surg. Oncol.* 2016;115(3):273–80. DOI: <https://doi.org/10.1002/jso.24490>
32. Jewell J.L., Guan K.L. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem. Sci.* 2013;38(5):233–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.004>
33. Fiedler T., Strauss M., Hering S., et al. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.* 2015;16(7):1047–55. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1026478>
34. Maletzki C., Rosche Y., Riess C., et al. Deciphering molecular mechanisms of arginine deiminase-based therapy — comparative response analysis in paired human primary and recurrent

- glioblastomas. *Chem. Biol. Interact.* 2017;278:179–88.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.007>
35. Feil S.C., Ascher D.B., Kuiper M.J., et al. Structural studies of *Streptococcus pyogenes* streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration. *J. Mol. Biol.* 2013;426(4):785–92.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.020>
36. Gruber C., Gratz I.K., Murauer E.M., et al. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing facilitates targeted delivery of suicide genes to cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2011;10(2):233–41.
DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0669>
37. Paiva A.D., Irving N., Breukink E., Mantovani H.C. Interaction with lipid II induces conformational changes in bovicin HC5 structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(9):4586–93.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00295-12>
38. Rodrigues G., Silva G.G.O., Buccini D.F., et al. Bacterial proteinaceous compounds with multiple activities toward cancers and microbial infection. *Front. Microbiol.* 2019;10:1690.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01690>
39. Liu Y.H., Wu P.H., Kang C.C., et al. Group A Streptococcus subcutaneous infection-induced central nervous system inflammation is attenuated by blocking peripheral TNF. *Front. Microbiol.* 2019;10:265. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00265>
40. Veckman V., Julkunen I. *Streptococcus pyogenes* activates human plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83(2):296–304. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0707457>
41. Loof T.G., Goldmann O., Medina E. Immune recognition of *Streptococcus pyogenes* by dendritic cells. *Infect. Immun.* 2008;76(6):2785–92. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01680-07>
42. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* 2007;13(9):1050–9.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1622>
43. Chen L., Zhou S., Qin J., et al. Combination of SLC administration and Tregs depletion is an attractive strategy for targeting hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer.* 2013;12(1):153.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-153>
44. Yang M., Zhang Z., Chen J., et al. Soluble fibrinogen-like protein 2 promotes the growth of hepatocellular carcinoma via attenuating dendritic cell-mediated cytotoxic T cell activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019;38(1):351.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1326-5>
45. Chen X., Tang Q., Wang J., et al. A DNA/DMXAA/metal-organic framework activator of innate immunity for boosting anticancer immunity. *Adv. Mater.* 2023;35(15):e2210440.
DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202210440>
46. Koya T., Yanagisawa R., Higuchi Y., et al. Interferon- α -inducible dendritic cells matured with OK-432 exhibit TRAIL and Fas ligand pathway-mediated killer activity. *Sci. Reports.* 2017;7:42145. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42145>
47. Li W., Chen G., Peng H., et al. Research progress on dendritic cells in hepatocellular carcinoma immune microenvironments. *Biomolecules.* 2024;14(9):1161.
DOI: <https://doi.org/10.3390/biom14091161>
48. Yoshida J., Ishibashi T., Nishio M. Growth-inhibitory effect of a streptococcal antitumor glycoprotein on human epidermoid carcinoma A431 cells: involvement of dephosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2001;61(16):6151–7.
49. Hytönen J., Haataja S., Gerlach D., et al. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol. Microbiol.* 2001;39(2):512–9.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02269.x>
50. Singh N., Baby D., Rajguru J.P., et al. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.* 2019;18(3):121–6.
DOI: https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18
51. Fukui H., Reynolds C.W. Antitumor activity of a *Streptococcus pyogenes* preparation (OK-432). II. Analysis of the cytotoxic lymphocytes induced by OK-432 injection into tumor-bearing F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 1987;79(5):1019–24.
52. Ryoma Y., Moriya Y., Okamoto M. Biological effect of OK-432 (picibanil) and possible application to dendritic cell therapy. *Anticancer Res.* 2004;24(5C):3295–301.
53. Henderson E.A., Ivey A., Choi S.J., et al. Group A streptococcal collagen-like protein 1 restricts tumor growth in murine pancreatic adenocarcinoma and inhibits cancer-promoting neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 2024;15:1363962.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1363962>
54. Marks L.R., Mashburn-Warren L., Federle M.J., et al. *Streptococcus pyogenes* biofilm growth *in vitro* and *in vivo* and its role in colonization, virulence, and genetic exchange. *J. Infect. Dis.* 2014;210(1):25–34. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu058>
55. Howell L.M., Forbes N.S. Bacteria-based immune therapies for cancer treatment. *Semin. Cancer Biol.* 2022;86(Pt. 2):1163–78.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.09.006>
56. Iwai T., Oebisu N., Hoshi M., et al. Promising abscopal effect of combination therapy with thermal tumour ablation and intratumoural OK-432 injection in the rat osteosarcoma model. *Sci. Rep.* 2020;10(1):9679.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66934-6>
57. Oba M.S., Teramukai S., Ohashi Y., et al. The efficacy of adjuvant immunochemotherapy with OK-432 after curative resection of gastric cancer: an individual patient data meta-analysis of randomized controlled trials. *Gastric Cancer.* 2016;19(2):616–24.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0489-9>
DOI: <https://doi.org/10.1097/00002371-200209000-00004>
58. Rebuffini E., Zuccarino L., Grecchi E., et al. Picibanil (OK-432) in the treatment of head and neck lymphangiomas in children. *Dent. Res. J. (Isfahan).* 2012;9(Suppl. 2):S192–6.
DOI: <https://doi.org/10.4103/1735-3327.109752>
59. Kong D., Zhang D., Cui Q., et al. Sapylin (OK-432) alters inflammation and angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Biomed. Pharmacother.* 2019;113:108706.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108706>
60. Happonen L., Collin M. Immunomodulating enzymes from *Streptococcus pyogenes* — in pathogenesis, as biotechnological tools, and as biological drugs. *Microorganisms.* 2024;12:200.
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010200>

Информация об авторах

Суворов Александр Николаевич[✉] — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. отд. микробиологии им. акад. РАН А.А. Тотоляна Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; зав. каф. фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, alexander_suvorov1@hotmail.com, suvorov.an@iemspb.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2312-5589>

Цапиева Анна Николаевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. био-медицинской микроэкологии отд. микробиологии им. акад. РАН А.А. Тотоляна Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, anna.tsapieva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7878-6339>

Чернов Александр Николаевич[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. отд. общей патологии и патологической физиологии и микробиологии им. акад. РАН А.А. Тотоляна Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; ассистент каф. биологической химии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, Санкт-Петербург, Россия, al.chernov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2464-7370>

Участие авторов: Суворов А.Н. — концепция, идея статьи, написание и редактирование статьи; Цапиева А.Н. — редактирование статьи, создание и оформление рисунков; Чернов А.Н. — написание, редактирование статьи, подготовка и оформление рисунков. 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 28.01.2025;
принята к публикации 19.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Alexander N. Suvorov[✉] — Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the RAS, Head, A.A. Totolyan microbiology department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Head, Department of fundamental problems of medicine and medical technologies, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, alexander_suvorov1@hotmail.com, suvorov.an@iemspb.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2312-5589>

Anna N. Tsapieva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biomedical microecology, A.A. Totolyan microbiology department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, anna.tsapieva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7878-6339>

Alexander N. Chernov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of general pathology and pathological physiology, A.A. Totolyan microbiology department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Assistant, Department of Biological Chemistry, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia, al.chernov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2464-7370>

Authors' contribution: Suvorov A.N. — concept, idea of the article, writing and editing of the article; Tsapieva A.N. — editing of the article, creation and design of drawings; Chernov A.N. — writing, editing of the article, preparation and design of drawings. 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 28.01.2025;
accepted for publication 19.04.2025;
published 28.04.2025



Современное состояние разработок в области создания вакцин против респираторно-синцитиального вируса

Котомина Т.С.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является основной причиной инфекций верхних дыхательных путей у детей и пожилых. В отношении РСВ одобрено единственное специфическое средство лечения — препарат моноклональных антител паливизумаб для пассивной иммунопрофилактики у младенцев из группы высокого риска. Спустя 60 лет с момента обнаружения вируса были лицензированы несколько безопасных вакцинных кандидатов против РСВ. Этому способствовали исследования по выявлению структуры РСВ, изучению основных функций компонентов РСВ, механизмов врождённого и приобретённого иммунного ответов на инфекцию. Был учтён отрицательный опыт клинического испытания формалин-инактивированной вакцины против РСВ на детях, закончившийся смертью нескольких вакцинированных.

Цель исследования — обобщить данные исследований вакцинных кандидатов против РСВ на лабораторных животных и в клинических испытаниях на различных возрастных группах.

Поиск статей для анализа доклинических и клинических испытаний вакцин против РСВ осуществляли с использованием электронно-поискового ресурса PubMed по ключевым словам «respiratory syncytial virus and vaccine». В качестве критериев отбора указывали, что оригинальные статьи должны содержать сведения о доклинических и клинических исследованиях, причём последние включали в себя I–IV фазы рандомизированных контролируемых испытаний. За 1967–2025 гг. обнаружено 296 статей, обобщающих данные по исследованию вакцинных кандидатов против РСВ, и 1788 статей, в которых суммированы данные об испытаниях вакцинных кандидатов на животных. В обзоре суммированы данные доклинических исследований вакцинных кандидатов с указанием разработчиков, состава вакцинных препаратов, животных моделей, на которых проводились исследования, с кратким описанием основных результатов. Представлены данные о клинических испытаниях вакцинных кандидатов с указанием целевых групп населения, номера клинического исследования и источников, где опубликованы результаты этих исследований.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус, вакцина, доклинические исследования, клинические исследования, обзор литературы

Источник финансирования. Исследование поддержано грантом РФФИ №24-75-10088.

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

Для цитирования: Котомина Т.С. Современное состояние разработок в области создания вакцин против респираторно-синцитиального вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(2): 239–264.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-675>

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

Current status of developments in the field of respiratory syncytial virus vaccines

Tatiana S. Kotomina

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of upper respiratory tract infections in children and the elderly. The only specific treatment approved for RSV is the monoclonal antibody Palivizumab for passive immunoprophylaxis in high-risk infants. Sixty years after the virus was discovered, several safe RSV vaccine candidates have been licensed. This was facilitated by research to identify the structure of RSV, to study the basic

functions of RSV components as well as the mechanisms of innate and acquired immune responses to infection. The negative result of a clinical trial of formalin-inactivated RSV vaccine in children, which resulted in the death of several vaccinated individuals, was taken into account.

The aim of the study was to summarize data from studies of RSV vaccine candidates in laboratory animals and in clinical trials on different age groups.

Articles for the analysis of preclinical and clinical trials of RSV vaccines were found, using the PubMed search engine with “respiratory syncytial virus and vaccine” as the keywords. The selection criteria were that original articles should contain information on preclinical and clinical studies, the latter including phase I–IV randomized controlled trials. From 1967 to the present year, 296 articles summarizing data from studies of RSV vaccine candidates and 1788 articles summarizing data from animal trials of vaccine candidates were found. The review summarizes data from preclinical studies of vaccine candidates and their developers, vaccine formulations, animal models on which the studies were conducted, as well as a brief description of the main findings. Data on clinical trials of vaccine candidates are presented, including target populations, clinical trial number and sources where the results of these trials were published.

Keywords: *respiratory syncytial virus, vaccine, preclinical studies, clinical studies, literature review*

Funding source. The study was supported by RNF grant No. 24-75-10088

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

For citation: Kotomina T.S. Current status of developments in the field of respiratory syncytial virus vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):239–264.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-675>

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

Введение

Среди тяжёлых острых респираторных заболеваний человека на долю респираторно-синцитиального вируса (РСВ) приходится примерно 22% случаев. При этом количество смертельных исходов ежегодно варьирует в промежутке примерно от 55 000 до 199 000, в том числе 50 000–75 000 среди детей в возрасте до 5 лет [1, 2]. После заболевания РСВ не формируется стойкого иммунитета, из-за чего не обеспечивается устойчивость организма к последующим заражениям [3, 4]. Причины, по которым так происходит, до сих пор не установлены. В 2023 г. компаниями «GlaxoSmithKline» (Великобритания) и «Pfizer» (США) были лицензированы субъединичные вакцины для профилактики инфекции, вызванной РСВ (РСИ), у людей старше 60 лет. Разработчик «Moderna» (США) представил матричную (мРНК) вакцину для профилактики РСИ у пожилых. Многие альтернативные вакцинные кандидаты находятся на разных стадиях клинических испытаний.

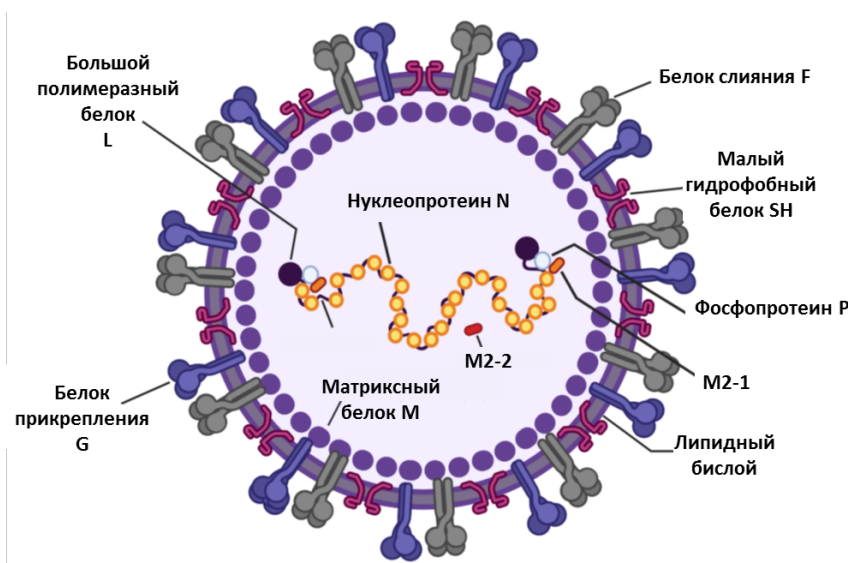
Цель обзора — суммировать данные о разработках вакцин против РСВ с использованием различных платформ и методических подходов, результаты их доклинических исследований на различных животных моделях и клинических испытаний на разных возрастных группах.

Общая характеристика респираторно-синцитиального вируса

РСВ принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Pneumoviridae* (пневмовирусов), роду *Orthopneumovirus*. До 2016 г. вирус относили к семейству *Paramyxoviridae* [5]. Другим представите-

лем семейства пневмовирусов является метапневмовирус человека. Оба пневмовируса занимают лидирующее положение в структуре заболеваемости детей с рождения до года, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом [6]. РСИ сопровождается тяжёлыми пневмониями и бронхолитами. По экспертным оценкам, в 2019 г. в мире по причине РСИ было около 3,6 млн случаев госпитализаций людей и 101 400 смертельных случаев, связанных с РСИ, среди детей в возрасте 0–60 мес [7].

Вирионы РСВ плеоморфны: различают сферические формы с диаметром 100–350 нм и нитевидные длиной до 10 мкм и диаметром 60–200 нм [8, 9]. Генетический материал РСВ представлен одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью размером 15,2 т. н. Геном РСВ несегментирован и содержит 10 открытых рамок считывания, кодирующих 9 структурных и 2 неструктурных белка. Ген *M2* содержит 2 открытые рамки считывания и кодирует 2 белка: *M2-1* и *M2-2*. Вирусная РНК упакована внутрь нуклеокапсида спирального типа симметрии, представляющего собой рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП) (рисунок). Репликация происходит с участием РНК-зависимой РНК-полимеразы, состоящей из большого L-белка и фосфопротеина P (кофактор L). В процессе транскрипции принимают участие P-, L- и *M2-1*-белки [10, 11]. РСВ относится к оболочечным вирусам, генетический материал которых окружён белковой оболочкой и липидным бислоем, приобретённым от клетки-хозяина в процессе сборки вируса и его отпочковывания. Матриксный белок M располагается между капсидом и внешним липидным бислоем. Во внешний липидный бислой встроены интеграль-



Структура РСВ.

Геном РСВ несегментирован, с отрицательной полярностью размером 15,2 т. н., кодирует 11 вирусных белков. Вирусная оболочка РСВ содержит 3 трансмембранных гликопротеина: белок прикрепления G, белок слияния F и малый гидрофобный белок SH. С внутренней стороны вирусной оболочки расположен матриксный белок M. Вирусная РНК инкапсулирована нуклеопротеином (N) и большим белком (L). Фосфопротеины P и M2-1 опосредуют транскрипцию вирусной РНК. M2-2 регулирует синтез вирусной РНК. Рисунок адаптирован из [16].

ный мембранный белок-слияния F, белок прикрепления G и малый гидрофобный SH белок. Белок F относится к гликопротеинам I класса. Его основная функция — обеспечение проникновения вируса в клетку-мишень. До взаимодействия с клеткой-мишенью белок F находится на поверхности РСВ в конформации «до слияния» (pre-F) и приобретает конформацию «после слияния» (post-F) вследствие слияния вирусной и клеточной мембран [12].

Белок M2-2 участвует в процессах репликации и транскрипции [13]. Белки NS1 и NS2 не входят в состав вириона, их основная роль заключается в том, что они выступают в качестве антагонистов α -/ β -интерферонов, которые вырабатываются организмом человека в ответ на вирусную инфекцию [14, 15].

Прототипы вакцин против РСВ

Впервые РСВ был обнаружен в 1956 г. [17], и уже более 60 лет ведутся работы по созданию вакцины против РСИ. Успешный опыт по созданию формалин-инактивированных вакцин против полиомиелита, кори и парагриппа был применён и для создания первых вакцин против РСВ, однако попытки оказались неудачными и требовались новые подходы к этой проблеме.

Большинство вакцин против РСВ разрабатываются на основе одного из самых консервативных белков РСВ — F, поскольку именно этот поверхностный белок является антигенной мишенью для вируснейтрализующих антител [18]. Получили развитие подходы, в которых F-белок стабилизирован в форме pre-F либо в форме post-F [19, 20]. Одна-

ко чаще разработчики выбирают pre-F, поскольку вируснейтрализующие антитела индуцируются в большем количестве именно к этой форме F-белка в условиях естественной инфекции или иммунизации [21].

История создания вакцин против РСВ

В 1950-х гг. одним из успешных приёмов было признано получение вакцин путём инактивации вируса формалином [22]. В США в 1960-х гг. были проведены сначала пилотные испытания формалин-инактивированной вакцины против РСВ (ФИ-РСВ) на младенцах, а затем крупномасштабные клинические испытания этой вакцины в группе детей разных возрастов. Самая молодая когорта включала детей в возрасте 2–7 мес. В опытной группе дети (в возрасте от 4 мес до 10 лет) получали 2 дозы ФИ-РСВ внутримышечно, а в контрольных группах — трёхвалентную вакцину против парагриппа [23]. У 68% вакцинированных ФИ-РСВ наблюдали 4-кратное увеличение уровня антител к РСВ по сравнению с контрольными группами [23]. В сезон циркуляции РСВ дети, получавшие ФИ-РСВ, болели тяжелее (7,9%), чем в группе контроля (4,7%) [23]. Усиление протекания заболевания наблюдали у детей младше 2 лет [23]. В другом исследовании участвовали дети в возрасте 2–7 мес; после вакцинации ФИ-РСВ наблюдали прирост нейтрализующих антител в 6 раз по сравнению с группой контроля [24]. В последующий за вакцинацией зимний период (1966/1967 гг.) в группе вакцинированных ФИ-РСВ детей заболел 21 ребёнок из 30 при естественном столкнове-

нии с РСВ, тогда как в группе контроля — в 5% случаев. Шестнадцати детям из группы ФИ-РСВ потребовалась госпитализация, 2 младенца погибли [24]. При сравнении результатов испытаний среди разных возрастных групп установлено, что дети из самой младшей группы в наибольшей степени подвержены риску тяжёлого протекания заболевания при иммунизации ФИ-РСВ в случае естественного заражения РСВ. Установлено, что развитие вакцин-индуцированного усиления протекания заболевания было вызвано тем, что детей первично иммунизировали ФИ-РСВ. Один из аргументов заключался в том, что у детей, ранее болевших РСВ, после иммунизации ФИ-РСВ не развивалось состояние иммунопатологии после заражения РСВ. Согласно другому аргументу, при внутримышечном введении живого РСВ РСВ-наивному ребёнку не наблюдается защитный эффект от вакцинации, однако и не развивается состояние иммунопатологии. Таким образом, при разработке вакцинных кандидатов против РСВ следует подробно охарактеризовать фенотип формирующихся Т-клеток памяти, а также В-клеток памяти с определённой антигенной специфичностью.

После неудачных клинических испытаний ФИ-РСВ начались попытки создания живой аттенуированной вакцины. Логика данной стратегии состоит в том, что при иммунизации РСВ будет реплицироваться исключительно в верхних дыхательных путях, в результате чего синтезированный вирусный антиген будет подвержен внутриклеточному процессингу и презентации на поверхности антигенпрезентирующих клеток, что будет способствовать формированию сбалансированного Т- и В-клеточного иммунного ответа. При вакцинации младенцев иммунный ответ будет формироваться локально в слизистой оболочке дыхательных путей, где наблюдается низкий уровень материнских IgG-антител [25]. Основное преимущество использования такой технологии — способ введения путём распыления в нос, рекомендованный к применению в педиатрии.

На начальных этапах возникли определённые трудности при создании живых аттенуированных вакцин, связанные с особенностями культивирования РСВ, термолабильностью и его низкой жизнеспособностью. Живой аттенуированный РСВ может быть получен несколькими способами: с помощью многократного пассирования вируса при пониженной температуре, либо с помощью мутагенеза, который предполагает обработку вирусом специальными мутагенами, либо путём введения мутаций в «дикий» вирус. Для ослабления РСВ обычно проводят манипуляции в белках SH или G [26]. Однако клинические испытания вакцинных кандидатов, полученных с помощью мутагенеза, показали, что не удаётся достигнуть баланса меж-

ду достаточной жизнеспособностью вакцинного штамма и его иммуногенностью. В 1980-х гг. под руководством Н.П. Лещинской был модифицирован низкотемпературный штамм, полученный от профессора П.М. Чанок (США), путём проведения дополнительных 16 последовательных пассажей при пониженной температуре. При интраназальной иммунизации данным вакцинным кандидатом детей в возрасте 1–2 лет наблюдали клинические реакции средней тяжести, которые коррелировали с 4-кратным приростом специфических РСВ-антител. Высокие титры антител сохранялись лишь в течение 6–8 нед после вакцинации, а затем снижались до исходного уровня [27]. Таким образом, благодаря механизмам аттенуации не удалось получить готовый вакцинный препарат, обеспечивающий поддержание длительного защитного иммунитета. При этом не было показано развития вакцин-индуцированной патологии при применении живых аттенуированных вакцин. В связи с неудачей классических методов начали разрабатываться альтернативные методы получения вакцин против РСВ.

Современные подходы к разработке вакцин против РСВ

После неудачного клинического испытания ФИ-РСВ разработка вакцин в этом направлении замедлилась, поскольку новые кандидаты проходили тщательную проверку на безопасность. С другой стороны, привлечение новых подходов и технологий для борьбы с РСИ привели к заметным достижениям в области вакцинопрофилактики.

Сведения о вакцинных кандидатах против РСВ, прошедших клинические испытания, подробно представлены во многих обзорах [28–31]. Отметим, что подобные обзоры следует обновлять каждый год в связи с актуальностью и важностью вопроса охвата вакцинацией групп населения, которым требуется вакцина против РСВ. Для доклинических испытаний по проверке эффективности и безопасности вакцин важно выбирать релевантные виды животных. В случае вакцин против РСВ необходимо целенаправленно изучать модель вакцин-индуцированного усиления протекания заболевания. Эта проблема подробно рассмотрена в обзоре G. Zhang и соавт. [32]. Совокупность ряда показателей, характеризующих врождённый и приобретённый иммунитет, которые связаны с тяжестью протекания РСИ у разных животных, представлена в обзоре S.B. Drysdale и соавт. [33]. В нашем обзоре собраны данные по испытаниям вакцинных кандидатов против РСВ на лабораторных животных, которые впоследствии тестировались на людях.

мРНК-вакцины

Альтернативой традиционным вакцинам служат вакцины на основе нуклеиновых кислот,

в частности, мРНК-вакцины. В их состав входят синтетические молекулы мРНК со структурой, позволяющей синтезировать целевой белок антигена при попадании в клетку-мишень. При разработке мРНК-вакцин особое значение придаётся системам доставки мРНК, поскольку молекулы мРНК являются нестабильными и подвергаются разрушению внеклеточными рибонуклеазами. Чаще применяются липидные наночастицы, но в настоящее время развиваются другие направления стратегии доставки. Например, технология клеточно-проникающих пептидов, позволяющая доставлять мРНК прицельно в антигенпрезентирующие клетки для индукции эффективного иммунного ответа [34].

Вакцинный кандидат mRNA-1345 («Moderna Inc.», США) кодирует поверхностный антиген F в конформации pre-F, который доставляется с помощью липидных наночастиц (LNP) [35]. Вакцина Spikevax («Moderna Inc.», США), используемая для иммунизации пациентов от 12 лет и старше против COVID-19, была разработана на основании результатов, полученных при исследованиях mRNA-1345 [36]. В 2024 г. вакцинный кандидат mRNA-1345 с названием mResvia был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для иммунизации пациентов старше 60 лет. Изначально разработчик создал несколько вакцинных кандидатов, содержащих мРНК, необходимых для получения экспрессии белка F в конформации pre-F (mRNA-1777 и mRNA-1172) [37, 38]. Вакцинный кандидат mRNA-1345 был получен в результате генетической модификации мРНК в составе mRNA-1172, проведённой для повышения экспрессии F-белка и изменения его распределения в инфицированных клетках [39, 40]. В 2023 г. были объявлены результаты III фазы клинических испытаний (ConquerRSV, NCT05127434) mRNA-1345 (впоследствии mResvia), согласно которым эффективность данной вакцины составила 83,7%. В исследовании оценивали клинический эффект от иммунизации в отношении двух симптомов, связанных с заболеваниями нижнего респираторного тракта у людей, вызванными РСИ [41]. В настоящее время ведутся клинические испытания вакцинного кандидата mRNA-1345 на детей в возрасте от 5 мес до 2 лет (NCT05743881). Проводятся клинические испытания на безопасность и эффективность mRNA-1345 у иммунизированных беременных и рождённых ими младенцев (NCT06143046).

В 2024 г. начались исследования I фазы клинических испытаний первой в мире двухвалентной мРНК-вакцины IN006 («InnoRNA», Китай), одобренной не только Национальным управлением по контролю за лекарственными средствами Китая, но и FDA. Данная мРНК-вакцина нацелена на экспрессию F-белка в конформации pre-F обоих серотипов

РСВ — А и В. В качестве системы доставки используются липидные наночастицы¹.

В настоящее время проводятся исследования I и II фаз клинических испытаний вакцинных кандидатов мРНК-вакцины LNP CL-0059 и LNP CL-0137 против РСВ («Sanofi», Франция). В описании исследования сообщается, что тестируются две разные липидные наночастицы для доставки мРНК (NCT05639894).

Векторные вакцины

Основу векторных вакцин составляют векторы-носители для доставки антигенов РСВ в клетки-мишени и индукции иммунного ответа в отношении антигенов вируса, находящихся во вставке. В настоящий момент клинические испытания проходят вакцины против РСВ, в которых в качестве вектора используются модифицированные вирусы осповакцины Анкара (MVA), аденовирусы, вирусы парагриппа крупного рогатого скота, вирус Сендай и вирусы гриппа.

В исследованиях Института экспериментальной медицины (Россия) в качестве вектора выступает живая гриппозная вакцина (ЖГВ). Три полиэпитопные кассеты РСВ отобраны для интегрирования в геном аттенуированного вируса гриппа [42]. Первая кассета содержит фрагмент F₂₄₃₋₂₉₄ с антигенным сайтом II F-белка РСВ, с которым связываются моноклональные антитела Паливизумаб. Две другие кассеты нацелены преимущественно на активацию цитотоксических Т-лимфоцитов при вакцинации и представлены эпитопами в составе белка M2-1 РСВ.

В экспериментах на лабораторных мышах выявлено, что рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие полиэпитопную Т-клеточную кассету, индуцируют развитие устойчивого, полностью функционального РСВ-специфического системного и локального CD8⁺-Т-клеточного иммунного ответа, обеспечивающего защиту иммунизированных животных от размножения РСВ в лёгких. Доказано, что иммунизация Т-клеточной векторной вакциной вызывает образование тканерезидентных Т-клеток памяти к встроенному иммунодоминантному CD8⁺-Т-клеточному эпитопу [43]. В то же время обнаружено, что встраивание фрагмента РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ в молекулу HA вируса гриппа является недостаточным для индукции защитных уровней РСВ-специфических антител у мышей. Однако иммунизация таким химерным вирусом препятствует развитию РС-индуцированной лёгочной патологии [44].

В НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (Россия) разработчики используют в качестве вектора

¹ Innorna Announces First Participant Dosed in Phase 1 Clinical Trial of Investigational Bivalent RSV mRNA Vaccine IN006; 2024. Available at: <https://innorna.com/news/330.html>

для доставки трансгена F-белка РСВ, содержащего антигенные сайты II и IV, модифицированный вирус гриппа A/PR/8/34, ослабленный за счёт укорочения NS1-белка до 124 аминокислотных остатков [45]. Полученный вакцинный кандидат RSV/Flu-01E прошёл I фазу клинических испытаний (NCT05970744) на добровольцах двух возрастных групп — 18–59 лет и пожилых старше 60 лет и II фазу клинических испытаний на добровольцах старше 60 лет.

Вакцинный кандидат MVA-BN-RSV («Bavarian Nordic A/S», Дания) сконструирован на основе модифицированного вируса осповакцины Ankara (MVA). Рекомбинантный вакцинный штамм MVA экспрессирует F- и G-белки обоих подтипов (A и B) РСВ, а также N- и M2-белки РСВ. Результаты фазы I клинических испытаний показали, что иммунизация MVA-BN-RSV индуцировала выработку гуморального и клеточного иммунного ответа против РСВ у людей в возрасте 18–65 лет [46]. Во II фазе клинических испытаний (NCT02873286) установлено, что MVA-BN-RSV хорошо переносилась иммунизированными людьми старше 55 лет и приводила к формированию стойкого иммунного ответа, сохраняющегося в течение как минимум 6 мес после однократного введения вакцины. По результатам второй иммунизации, проведённой через год после первой, выявлено, что уровень T-клеточного иммунного ответа выше или схож с тем, который наблюдался после первой иммунизации [47]. Однако в ходе III фазы клинических испытаний эффективности у лиц старше 60 лет было признано, что иммунизация MVA-BN-RSV не достигла конечной точки исследования и неэффективна².

В исследовании RSV001 (NCT01805921) были изучены две рекомбинантные вакцины: PanAd3-RSV и MVA-RSV («ReiThera», Италия). PanAd3-RSV была разработана на основе аденовируса обезьян, MVA-RSV — на основе модифицированного вируса коровьей оспы Ankara [48, 49]. В качестве антигенов РСВ использовали белки: F (F₀ ΔTM — полноразмерный, F — без трансмембранного домена), N и M2-1, которые доставляются в клетку-мишень аденовирусным вектором обезьян с дефектом репликации (PanAd3) либо MVA-вектором [50]. Вакцинные кандидаты PanAd3-PCB и MVA-PCB, вводимые в разных комбинациях разными способами (внутримышечное и интраназальное введение PanAd3, внутримышечное — MVA), хорошо переносились и были иммуногенны у взрослых людей (18–50 лет) [51]. В исследовании RSV001 (NCT01805921) у пожилых лиц (60–75 лет) фикси-

ровалась индукция гуморального и клеточного иммунного ответа после иммунизации [52].

Вакцинный кандидат VXA-RSV-f («Vaxart», США) разработан на основе аденовируса 5-го подтипа, экспрессирующего F-белок РСВ и молекулярный адьювант в виде двухцепочечной РНК [53]. I фаза клинических испытаний (NCT02830932) была проведена на людях в возрасте 18–49 лет и закончилась в 2018 г.³ Результаты до настоящего времени не опубликованы.

Вакцинный кандидат Ad26.RSV.Pre-F («Janssen», Бельгия) сконструирован на основе аденовируса 26-го типа, экспрессирующего F-белок в конформации pre-F [54]. В I и II фазах клинических испытаний (NCT03502707) на пожилых (старше 60 лет) были опробованы разные схемы введения вакцины, в том числе в сочетании с рекомбинантным F-белком. У иммунизированных по комбинированной схеме людей наблюдалась более интенсивная выработка гуморального и клеточного иммунного ответа по сравнению с группой, которой вводили только Ad26.RSV.preF [55]. Во II фазе (NCT03339713) клинических испытаний оценивали сочетанное введение Ad26.RSV.preF и вакцины против сезонного гриппа («Fluarix», GSK). Показано, что у пожилых людей (старше 60 лет) вакцина продемонстрировала приемлемый профиль безопасности и отсутствие признаков иммунной интерференции [56]. В ходе I/a фазы (NCT03303625) клинических испытаний Ad26.RSV.Pre-F показано, что благодаря иммунизации у РСВ-серопозитивных детей в возрасте 12–24 мес и взрослых (18–50 лет) вырабатываются РСВ-специфические нейтрализующие антитела, сохраняющиеся в течение 7 мес. Кроме того, иммунизированные Ad26.RSV.Pre-F были менее подвержены заражению РСВ в естественных условиях [57].

ChAd155-RSV («GlaxoSmithKline», Великобритания) разработана на основе аденовируса-155 шимпанзе и кодирует белки РСВ F, N и M2-1 [58]. Вакцинный кандидат был предварительно протестирован на телятах, у которых механизмы иммунного ответа на РСИ наиболее приближены к детям. После вакцинации телят индуцировались нейтрализующие антитела к РСВ, отсутствовали признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания и была продемонстрирована защита против бычьего РСВ [59]. В ходе I/II фазы клинических испытаний (NCT02927873) РСВ-серопозитивных детей в возрасте 12–23 мес иммунизировали ChAd155-RSV и наблюдали в течение 2 лет после вакцинации. В результате отмечалось дозозависимое увеличение титров нейтрализующих антител к РСВ [60].

² Bavarian Nordic. Bavarian Nordic Provides Update on RSV Vaccine Program. URL: <https://www.bavarian-nordic.com/investor/news/news.aspx?news=6808>

³ ClinicalTrials.gov. Dose-Ranging Trial of Safety & Immunogenicity of an Oral Adenoviral-Vector Based RSV Vaccine (VXA-RSV-f). URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02830932>

По опубликованным результатам I/II фазы клинических испытаний (NCT03636906) ChAd155-RSV на детях в возрасте 6–7 мес показано, что иммунизация вызывала индукцию гуморального иммунного ответа у иммунизированных, при этом не развивались признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания [61].

Вакцинный кандидат MEDI-534 («MedImmune», в данный момент «AstraZeneca», США) разработан на основе химерного вируса парагриппа для крупного рогатого скота и человека третьего типа (PIV3), экспрессирующего F-белок РСВ [62]. В I фазе клинических испытаний (NCT00345670) с участием детей, ранее болевших РСВ, эта живая аттенуированная интраназальная вакцина была безопасной, но иммуногенность была очень низкой [63]. Однако при тестировании на младенцах, серонегативных к РСВ, являющихся целевой популяцией для этой вакцины, MEDI-534 хорошо переносилась иммунизированными и индуцировала иммунный ответ против РСВ примерно в 50% случаев, а против вектора PIV3 — во всех случаях [64].

Вакцинный кандидат SeVRSV (NIAID, США) представляет собой способный к репликации вирус Сендай, штамм мышинового парагриппа первого типа (PIV-1), который экспрессирует F-белок РСВ. На основании I фазы клинических испытаний (NCT03473002) выявлено, что иммунизация SeVRSV людей в возрасте 18–45 лет приводит к формированию низкого уровня иммунного ответа к РСВ. Этот факт объясняется наличием предсуществующего иммунитета в этой возрастной группе к вектору [65].

Живая аттенуированная вакцина

Существует несколько подходов к созданию живых аттенуированных вакцин против РСВ. В основе традиционного подхода лежит чувствительность вируса к определённым температурам репродукции или к воздействию химических агентов. Альтернативный подход базируется на использовании методов обратной генетики для получения ослабленного репликационно-компетентного вируса. Вакцины, разработанные при помощи методов обратной генетики, тестировались на младенцах в возрасте от 4 нед [66, 67]. Живые аттенуированные вакцины рассматриваются как безопасные для детей, ранее не болевших РСВ, поскольку их использование не вызывает вакцининдуцированного усиления протекания заболевания после инфицирования РСВ [24, 68]. Кроме этого, живые аттенуированные вакцины обычно выпускают в виде назальных капель. Попадая в дыхательные пути, они реплицируются в них, независимо от наличия материнских антител, обеспечивая формирование как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [69, 70].

Одним из способов получения аттенуированного штамма РСВ является делеция гена *SH*. Таким

образом были разработаны несколько вариантов вакцин.

Вакцинный кандидат rA2cp248/404/1030ΔSH сконструирован с несколькими температурочувствительными мутациями, с мутациями, полученными при пассировании вируса при низкой температуре, и с делецией гена *SH*. При исследовании иммуногенности rA2cp248/404/1030ΔSH на РСВ-серонегативных детях в возрасте 1–2 мес отмечена высокая иммуногенность вакцины. Вакцинный кандидат был слабо иммуногенным у РСВ-серопозитивных детей и взрослых [67].

Вакцинный кандидат MEDI-559 («MedImmune», в данный момент «AstraZeneca», США) отличается от предыдущего кандидата наличием 39 молчащих нуклеотидных замен [71]. Оба вакцинных кандидата — rA2cp248/404/1030ΔSH и MEDI-559 — были протестированы на здоровых детях в возрасте 5–24 мес, ранее не болевших РСВ. Однако по результатам исследований была обнаружена недостаточная генетическая стабильность обоих кандидатов, склонность к реверсии отдельных точечных мутаций, приводящих к снижению температурной чувствительности, которая наблюдалась у более трети изолятов вакцинного вируса [71, 72].

Вакцинный кандидат RSVcps2 (NIAID, NIH/Wyeth, США) представляет собой стабилизированную версию вакцины MEDI-559. Согласно результатам I фазы клинических испытаний (NCT01852266 и NCT01968083) на детях в возрасте 6–24 мес, RSVcps2 хорошо переносится и обладает умеренной иммуногенностью [73].

Аттенуированного фенотипа живой вакцины можно добиться с помощью делеции гена *M2-2* РСВ. Делеция *M2-2* приводит к сдвигу в программе синтеза вирусной РНК, что увеличивает уровень транскрипции вирусной РНК и экспрессию вирусного антигена, но снижает репликацию вирусного генома [74].

Оценивали два вакцинных кандидата MEDI/ΔM2-2 (NIAID, США) и LID/ΔM2-2 (NIAID, США) [75, 76]. Оба варианта содержат делецию *M2-2*, оба получены из разных производных кДНК РСВ одного подтипа A2, отличающихся на 21 нуклеотидную последовательность, расположенную в разных местах генома. У вакцинного кандидата LID/ΔM2-2 удалены нетранслируемые области гена *SH* и добавлены молчащие замены (сайлент мутации) в *SH*-белок РСВ. Внесённые мутации не влияют на фенотип собранного вируса, что подтверждается экспериментами на мышах [77]. Вакцинация обоими кандидатами стимулировала выработку РСВ-нейтрализующих антител, при этом LID/ΔM2-2 считалась более эффективной, поскольку обеспечивала небольшое увеличение репликации. В среднем пиковое значение титра вируса, выделяемого вакцинированными, было в 100 раз выше у тех, кто

получил LID/ Δ M2-2 [75, 76]. В связи с этим было предложено модифицировать вакцинный кандидат LID/ Δ M2-2 путём внесения либо дополнительной мутации в L-белок, вызывающей температурочувствительность, либо 5 точечных мутаций в белки N, F и L, которые ранее были обнаружены в аттенуированном штамме РСВ и связаны с адаптацией к пониженной температуре. Из-за активной репликации кандидат LID/ Δ M2-2 был модифицирован. Однако впоследствии вакцинный кандидат LID/cp/ Δ M2-2 оказался гиператтенуированным, имел низкий инфекционный титр и стимулировал выработку антител лишь у части участников клинических испытаний [76].

Вакцинный кандидат LID/ Δ M2-2/1030s был создан путём добавления генетически стабилизированной мутации 1030s. По результатам I фазы клинических испытаний (NCT02237209, NCT02040831) на детях в возрасте 6–24 мес был установлен высокий титр нейтрализующих антител у иммунизированных, который, по экспертным оценкам, был клинически эквивалентным титру антител, образующихся при натуральной РСИ [78].

Модифицированный вакцинный кандидат на основе LID — D46/NS2/N/ Δ M2-2-HindIII был сконструирован так, чтобы добиться сходного фенотипа с кандидатом MEDI/ Δ M2-2. В целом он оказался более аттенуированным по сравнению с LID/ Δ M2-2, но демонстрировал высокие значения вирусных титров [76].

В исследованиях, проведённых С.С. Stobart и соавт., показано, что рекомбинантный штамм РСВ OE4 (RSV-A2-dNS1-dNS2- Δ SH-dG_m-G_{s_{null}}-line19F) с повышенным уровнем антигена F в конформации pre-F демонстрирует термостабильность и иммуногенность, несмотря на сильную аттенуацию в дыхательных путях хлопковых крыс [79].

Другая многообещающая стратегия заключается в делециях NS1 и NS2, которые нарушают TGF β -сигнальный путь клетки хозяина, преобразуя иммунный ответ с целью повышения репликации вируса [80, 81].

В результате I фазы клинических испытаний фазы (NCT03227029 и NCT03422237) вакцинного кандидата RSV/ Δ NS2/ Δ 1313/11314L («Sanofi», Франция) установлены иммуногенность и защитная эффективность вакцины у РСВ-серонегативных детей в возрасте 6–24 мес [82]. В настоящее время проходит III фаза клинических испытаний (NCT06252285) вакцинного кандидата RSV/ Δ NS2/ Δ 1313/11314L, в которой принимают участие 6300 детей в возрасте 6–22 мес.

Субъединичные вакцины

Большинство разрабатываемых субъединичных вакцин против РСВ содержат поверхностный F-белок в конформации pre-F [83]. Повышение

иммуногенности таких вакцин достигается использованием адъювантов либо проведением многократных иммунизаций [84]. Принимая во внимание состав субъединичных вакцин и учитывая неудачу клинических испытаний ФИ-РСВ, особое внимание уделяют безопасности. Установлено, что иммунизация ФИ-РСВ приводит к недостаточной выработке антител с нейтрализующей активностью. Последующие признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания объясняются в том числе слабой стимуляцией Toll-подобных рецепторов в В-клетках, что влечёт за собой отсутствие процесса аффинного созревания антител [85]. Таким образом, созревание аффинности вследствие стимуляции Toll-подобных рецепторов является ключевым фактором, помогающим предотвратить состояние вакцин-индуцированного усиления заболевания. В настоящее время субъединичные вакцины разрабатываются для беременных, пожилых и подростков, которые ранее болели РСВ, чтобы снизить риск развития вакцин-индуцированного заболевания [30, 86].

Вакцинный кандидат DS-Cav1 (NIAID, США) создан на основе F-белка в конформации pre-F [87]. В ходе I фазы клинических испытаний DS-Cav1 на взрослых в возрасте 18–50 лет (NCT03049488) обнаружено, что у иммунизированных наблюдался прирост РСВ-F-специфических антител с нейтрализующей активностью. При этом уровень нейтрализующих антител был выше базового уровня на протяжении 10 мес после иммунизации [88]. В данном исследовании в качестве адъюванта использовали гидроксид алюминия.

Вакцинный кандидат DepoVax-RSV или DPX-RSV («ImmunoVaccine Technologies Inc.», Канада) разработан на основе эктодомена белка SH (SHe) РСВ. Этот пептид вводится с адъювантом DepoVax, благодаря которому обеспечивается длительное воздействие антигена на иммунную систему. Согласно результатам I фазы клинических испытаний (NCT02472548), после введения DPX-RSV у иммунизированных людей в возрасте 50–64 лет был зафиксирован прирост анти-SHe-специфических антител [89].

В мае 2023 г. FDA одобрило первую вакцину Agexvu («GlaxoSmithKline», Великобритания) для людей старше 60 лет. Эта вакцина содержит F-белок РСВ в конформации pre-F и вводится вместе с адъювантом AS01E для обеспечения защитного эффекта в отношении РСВ подтипов А и В. По результатам I фазы клинических испытаний (NCT03814590 и NCT04090658) Agexvu на людях в возрасте 60–80 лет установлено, что иммунизация способствовала образованию РСВ-специфических IgG-антител, нейтрализующих антител и CD4⁺-Т-клеток, которые обнаруживались у иммунизированных спустя год [90, 91]. По результатам II фазы клинических испытаний (NCT04657198) зафикси-

ровано повышение эффективности иммунизации после ревакцинации участников исследования спустя 1,5 года после первой иммунизации [92]. В период с 2023 г. по июнь 2025 г. было анонсировано 2b рандомизированное открытое исследование эффективности и безопасности Agexvu. Участниками исследования стали люди в возрасте 18 лет и старше, перенёвшие трансплантацию лёгких или почек, а также подверженные повышенному риску заболеваний нижних дыхательных путей в сравнении со здоровыми людьми в возрасте 50 лет и старше (NCT05921903). В одном из исследований в рамках III фазы клинических испытаний (NCT04732871) сообщалось об увеличении титра нейтрализующих антител к РСВ и о случаях нежелательных явлений, вызванных иммунизацией [93]. По последним опубликованным данным III фазы клинических испытаний (NCT04886596) оценена эффективность иммунизации Agexvu у 24 967 участников в течение 2 эпидемиологических сезонов циркуляции РСВ. Эффективность иммунизации Agexvu составила около 67,2% в отношении заболеваний нижнего респираторного тракта и около 78,8% в отношении тяжёлой формы протекания заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных РСВ [94].

На основании промежуточных результатов III фазы клинических испытаний (NCT05035212) была одобрена ещё одна субъединичная вакцина для профилактики РСИ у пожилых — Abyrsvo («Pfizer», США), в состав которой входит F-белок РСВ в конформации pre-F. По результатам I фазы клинических испытаний Abyrsvo у иммунизированных вырабатывались РСВ-специфические IgG-антитела к A- и B-штаммам РСВ [95]. Во II фазе клинических испытаний Abyrsvo тестировалась на беременных и беременных женщинах (NCT04071158 и NCT04032093). Недавно завершилось клиническое исследование III фазы (NCT04424316) у беременных женщин. Установлено, что РСВ-ассоциированные заболевания у младенцев, рождённых у иммунизированных во время беременности матерей, выявлялись реже, чем у неиммунизированных [96]. В рамках III фазы клинического исследования RENOIR (NCT05035212) определено, что эффективность профилактики заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных РСВ, составляет около 66,7% [97]. В рамках клинического исследования III фазы MONET (NCT05842967) иммунизировали людей в возрасте 18–59 лет с хроническими заболеваниями, подверженных риску развития РСИ в тяжёлой форме. Вакцина хорошо переносилась, была безопасной и иммуногенной [98]. В целом, показатели РСВ-специфических нейтрализующих антител у иммунизированных из исследования MONET были не ниже, чем у иммунизированных пожилых старше 60 лет из исследования RENOIR (NCT05035212).

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Вакцины на основе вирусоподобных частиц принято считать одним из подклассов субъединичных вакцин. Эти вакцины синтезируются путём самосборки наночастиц, которые экспонируют на своей поверхности множественные копии выбранного вирусного антигена. Высокий уровень гуморального и клеточного иммунного ответа достигается благодаря не только многократному повторению участков антигена, но и иммуностимулирующим свойствам матрицы для иммобилизации наночастиц [99]. Отсутствие вирусного генома в составе этих вакцинных кандидатов делает их безопасными ввиду неспособности воспроизводить жизнеспособные вирионы.

Вакцинный кандидат ResVax («Novavax», США) создан на основе F-белка РСВ и представляет собой вакцину на основе вирусоподобных частиц. Вакцина разрабатывается для защиты младенцев путём вакцинации будущих матерей, детей в возрасте от 6 мес до 5 лет и пожилых лиц старше 60 лет. В результате II фазы клинических испытаний (NCT02247726) установлено, что иммунизация здоровых беременных женщин вызвала выработку нейтрализующих антител к РСВ, которые эффективно передавались новорождённому [100]. Успехи этого этапа исследований позволили включить вакцинный кандидат ResVax в программу исследований PREPARE (многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование III фазы, NCT02624947). В рамках клинического исследования велись наблюдения за младенцами, рождёнными в самом начале эпидемического сезона циркуляции РСВ от матерей, иммунизированных ResVax в III триместре [101]. Оказалось, что иммунизация ResVax не была эффективной. Несмотря на это, было заявлено, что благодаря использованию ResVax удалось снизить на 44% случаи госпитализаций у детей, связанных с инфекциями нижних дыхательных путей, вызванными РСВ. Кроме того, было зафиксировано снижение РСВ-специфических заболеваний нижних отделов респираторного тракта на 39,4% и снижение РСВ-ассоциированной гипоксемической дыхательной недостаточности у младенцев младше 3 мес на 58,8% [101].

Вакцинный кандидат SynGEM («Virtuvax», Нидерланды) представляет собой мукозальную вакцину, содержащую F-белок в конформации pre-F, связанный с бактериоподобными частицами, полученными из *Lactococcus lactis*. Благодаря бактериоподобным частицам вакцинный антиген РСВ предстает в более естественной конформации, а также наблюдается усиленный иммунный ответ в отношении РСВ [102]. Клинические испытания вакцины без адъюванта были неэффективны в группе пожилых. Вакцинация способствовала снижению на 61% случаев госпитализации пожилых с хронической обструктивной болезнью лёгких. По результатам

I фазы клинических испытаний у иммунизированных лиц не наблюдался прирост нейтрализующих антител в сыворотках крови, которые распознают эпитопы в составе уникального Ø сайта F-белка [103, 104]. Тем не менее вакцина индуцировала выработку паливизумаб-подобных антител. В настоящее время клинические испытания данной вакцины приостановлены.

Вакцинный кандидат V-306 («Virometrix», Швейцария) содержит пептид, состоящий из миметиков F-белка РСВ, имитирующих антигенный сайт II. Пептид конъюгирован с синтетическими наночастицами, изготовленными из самоорганизующихся липопептидов. В ходе I фазы клинических испытаний (NCT04519073) установлено, что вакцина V-306 безопасна и иммуногенна для здоровых женщин в возрасте 18–45 лет [105].

Заключение

РСВ является причиной тяжёлых респираторных заболеваний у детей 1-го года жизни, людей с ослабленным иммунитетом и пожилых лиц [106, 107]. Клиническая картина протекания РСИ проявляется по-разному — от лёгких инфекций верхних и нижних дыхательных путей до пневмоний и бронхолитов у детей.

На настоящий момент FDA одобрило использование 3 вакцин для профилактики РСИ у людей. Двухвалентная субъединичная вакцина Abrysvo («Pfizer», США) одобрена для использования у беременных и пожилых людей. Субъединичная вакцина Arexvy («GlaxoSmithKline», Великобритания) и мРНК-вакцина mRESVIA («Moderna», США) разрешены для применения у людей старше 60 лет.

Продолжаются разработки и исследования эф-

фективности вакцин против РСВ для детей, представляющих основную целевую группу. В данном случае к основным проблемам относят необходимость вакцинировать младенцев на раннем этапе (2–4 мес), выявленный эффект усиления протекания заболевания, связанный с введением ФИ-РСВ с адьювантом квасцов, трудности в достижении требуемых показателей профилактической эффективности. Долгое время единственным специфическим средством лечения РСИ являлся препарат моноклональных антител Паливизумаб, обычно назначаемый лицам, подверженным высокому риску развития тяжёлых форм заболевания. В данном случае значимым фактором является высокая стоимость курса лечения этим препаратом, что делает его недоступным в странах с наибольшим ущербом от РСВ [108].

В 2022–2023 гг. был одобрен препарат моноклональных антител Нирсевимаб («AstraZeneca», Великобритания; «Sanofi», Франция), рекомендованный для назначения детям в случаях тяжёлого протекания РСИ и её осложнениях [109].

На данный момент разрабатываются вакцины для женщин репродуктивного возраста и беременных с целью защиты когорты наивных младенцев, а также для защиты пожилых лиц и детей. На разных фазах клинических испытаний находятся вакцины на основе вирусоподобных частиц, векторные, субъединичные и живые аттенуированные вакцины.

Актуальные сведения о вакцинных кандидатах, находящихся на стадии доклинических исследований, представлены в **табл. 1**. Сведения о кандидатах, изученных в разных фазах клинических испытаний, суммированы в **табл. 2**.

Таблица 1. Результаты доклинических испытаний вакцинных кандидатов против РСВ

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адьювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
Живые аттенуированные вакцины				
RSV-MinL4•0 («Codagenix», США)	RSV-Min L — вакцинный кандидат, полученный при помощи внесения «молчащих» мутаций (кодонная деоптимизация) (без адьюванта)	Африканские зелёные мартышки (и.н. + и.т.)	RSV-MinL4•0 более аттенуирован, чем РСВ А2, при введении 2×10^6 БОЕ (по 10^6 и.н. и и.т.): значение пиковых вирусных титров в мазках из трахеи в группе иммунизированных RSV-MinL4 в 100 раз меньше, чем в группе wt РСВ. При заражении РСВ А2 в дозе 2×10^6 БОЕ на 104-й день эксперимента выявили защитный потенциал RSV-MinL4•0: пиковые значения по выделению вируса на 6-й день в мазках из трахеи и из ротоглотки были в 1000 и в 100 раз меньше, чем в группе наивных мартышек соответственно	[110]
IT-RSVΔG («Intravacc», Нидерланды)	Изолят РСВ штамм 98-25147-X (pPCB-X), у которого удалён ген, кодирующий G-белок (ΔG) (без адьюванта)	Хлопковые крысы (и.н.)	pPCB-X ΔG был более аттенуирован по сравнению с вектором pPCB-X при введении 10^5 ТЦИД ₅₀ : значение пиковых титров в лёгких и нозах было в 4–5 раз ниже, чем в группе pPCB-X. Однократная вакцинация pPCB-X ΔG защитила крыс от заражения вирусом РСВ-X в дозе 10^6 ТЦИД ₅₀ : на 5-й день после челленджа вирус не обнаруживали в лёгких иммунизированных животных, тогда как в группе плацебо вирус размножился до $5 \log_{10}$ ТЦИД ₅₀ в лёгких. Вакцинация pPCB-X ΔG не приводила к развитию бронхолёгочной патологии, а гистопатологические признаки поражения были значительно снижены по сравнению с группой наивного контроля	[111]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адьювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
MV-012–968 («Meissa», США)	RSV-A2-dNS1-dNS2-ΔSH-dGmGsnnull-line19F кодонная деоптимизация генов NS1, NS2; удалён ген SH (ΔSH). F-белок в конформации «до слияния». В ген G введена точечная мутация (M48I) для подавления экспрессии секретируемой формы белка G (Gsnnull). Мембраносвязывающая форма Gm подвергнута кодонной оптимизации (dGm) (без адьюванта)	Мыши BALB/c (и.н.)	При введении MV-012–968 в дозе 10 ⁶ фокус-формирующих единиц (FFU) вирусная нагрузка в лёгких была достоверно ниже, чем у мышей, заражённых РСВ А2 и РСВ А2-19F. Вакцинация MV-012–968 обеспечивала защиту мышей от заражения РСВ А2-line19F в дозе 10 ⁵ БОЕ: в группе MV-012–968 вирус не выделялся спустя 5 дней после челленджа. Продукция слизи в лёгких у кандидата MV-012–968 была достоверно ниже, чем у РСВ А2-line 19F и RSV A2-del-M2 на 5 сутки после челленджа	[79]
		Хлопковые крысы (и.н.)	Репликация MV-012–968 (OE4), введённого в дозе 10 ⁵ FFU, отсутствовала в носках и лёгких хлопковых крыс. MV-012–968 (OE4) полностью защищала крыс от заражения РСВ-A2-line19F в дозе 10 ⁶ FFU на 42-й день после вакцинации. В отличие от ФИ-PCB, вакцинация MV-012–968 (OE4) не вызывала гистопатологических изменений в лёгких после заражения РСВ	[19]
RSV ΔNS2/Δ1313/1314L (NIAID/NIH, «Sanofi», США)	Кандидат с ts-мутациями в L-белке (делеция в 1313-м положении, компенсаторная мутация I1314L, которая появляется в результате пассирования вируса при постепенном повышающихся температурах); делеция NS2 (ΔNS2) (без адьюванта)	Мыши BALB/c (и.н.)	Кандидат RSV ΔNS2/Δ1313/1314L гиператтенуирован для мышей. Вариант RSV/Δ1313 при введении в дозе 10 ⁶ БОЕ размножался в дыхательных путях мышей значительно слабее по сравнению с wt РСВ. Эта животная модель не подходит для оценки иммуногенности и защитной эффективности гиператтенуированных вакцинных кандидатов	[112, 113]
		Ювенильные шимпанзе (и.н. + и.т.)	При иммунизации шимпанзе RSV ΔNS2/Δ1313/1314L в дозе по 10 ⁶ БОЕ (и.н. + и.т.) пиковые значения вирусной нагрузки были в 3–25 раз ниже по сравнению с высокоаттенуированными кандидатами MEDI-559 (rA2 sr248/404/1030ΔSH) и srps2 (генетически стабилизированная версия MEDI-559) в носовых смывах. Титр вируса RSV ΔNS2/Δ1313/1314L в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и смывах из трахеи, наоборот, был в 20 раз выше, чем в группах сравнения. Вакцина индуцировала высокие уровни РСВ вируснейтрализующих антител, однако экспериментов по защите от РСИ в данной работе не проводились	[113]
Рекомбинантные векторные вакцины				
MVA-BN RSV («Bavarian Nordic BN», Дания)	MVA (модифицированная вакцина Анкара), в состав которой включены гены, кодирующие F, G, N и M2-1 (PCB A) и G (PCB B) (без адьюванта)	Мыши: BALB/c (и.н.)	Мышей иммунизировали MVA-BN RSV в дозе 1 × 10 ⁸ ТЦИД ₅₀ с интервалом 3 нед и через 2 нед заражали PCB A2 в дозе 1 × 10 ⁶ БОЕ. Через 4 дня после челленджа вирус в лёгких не был обнаружен. В группах, в которых применяли селективную деплецию CD4 и CD8 T-клеток, вирус размножался в лёгких в 600–2000 раз слабее, чем в группе контроля	[114]
PanAd3-RSV и MVA-RSV («ReiThera», Италия)	PanAd3 (аденовирус обезьян) и MVA, в состав которых включены гены, кодирующие F, N, M2-1 (PCB) (без адьюванта)	Хлопковые крысы (и.н., в.м.)	PanAd3-RSV (5 × 10 ⁸ вирусных частиц) и MVA-RSV (1 × 10 ⁷ БОЕ) вводили в разных комбинациях с интервалом 4 нед. Во всех группах крысы были защищены от PCB, введённого в дозе 1 × 10 ⁵ БОЕ: на 5-е сутки вирус не размножался в лёгких. Челлендж-вирус не размножался в носках в группах PanAd3-RSV/MVA (в.м.) и PanAd3-RSV/PanAd3-RSV. Патологические изменения в лёгких после челленджа были менее выражены в группе PanAd3-RSV/MVA (в.м.) по сравнению с группой ФИ-PCB, тогда как остальные группы демонстрировали гистопатологию, схожую с группой основного контроля после челленджа	[115]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адьювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
		Телята (2–4 нед) (и.н., в.м.)	PanAd3-RSV (5×10^{10} вирусных частиц) и MVA (2×10^7 БОЕ) вводили телятам в разных комбинациях с интервалом 4 нед. На 6-й день после челленджа РСВ, введённый в дозе 10^4 БОЕ, не реплицировался в дыхательных путях телят из групп PanAd3-RSV/MVA (в.м.), PanAd3-RSV (в.м.)/PanAd3-RSV (в.м.), PanAd3-RSV/PanAd3-RSV (в.м.), PanAd3-RSV (в.м.)/MVA (в.м.). В группе PanAd3-RSV/PanAd3-RSV вирус размножился в лёгких. В группе PanAd3-RSV/MVA (в.м.) вирус не обнаруживали в носгах и не обнаруживали макроскопических поражений лёгких. У телят, иммунизированных по схеме гетерологичного прайм-буста, после челленджа в меньшей степени развивалась массивная инфильтрация полиморфноядерных нейтрофилов в лёгких и БАЛ по сравнению с телятами из групп гомологичного прайм-буста	[115]
		Макаки (и.н., в.м.)	PanAd3-RSV (5×10^{10} вирусных частиц) и MVA (2×10^7 БОЕ) вводили макакам в разных комбинациях с интервалом 8 нед. Продукция интерферона- γ и интерлейкина-4 в мононуклеарных клетках периферической крови усиливалась в 6 раз после буста. Продукция интерлейкина-4 в мононуклеарных клетках была выше в группе PanAd3-RSV/MVA (в.м.) по сравнению с PanAd3-RSV (в.м.)/MVA (в.м.). Спустя 1 нед после 2-й иммунизации в мононуклеарных клетках преобладала популяция CD4 ⁺ -Т-клеток. Только у макака, иммунизированных PanAd3-RSV, вырабатывались РСВ-специфические IgA. У макака, иммунизированных PanAd3-RSV (в.м.), в 40 раз был выше титр нейтрализующих антител по сравнению с PanAd3-RSV. Защитный эффект иммунизации не оценивали	[50]
		Мыши BALB/c (в.м.)	Двукратная иммунизация мышей с интервалом 4 нед кандидатами Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F в разных комбинациях в дозе 10^{10} вирусных частиц стимулировала выработку РСВ F-специфического Т-клеточного иммунного ответа на 12-й неделе: высокие уровни продукции интерферона- γ , фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-2 CD8 ⁺ -Т-клетками были в группе Ad.35.RSV.F/Ad26.RSV.F и Ad.26.RSV.F/Ad35.RSV.F. Иммунный ответ у мышей во всех группах развивался по типу Th1: фиксировались высокие соотношения IgG2a/IgG1 по сравнению с группой ФИ-РСВ. Высокий уровень нейтрализующих антител в группах Ad.35.RSV.F/Ad26.RSV.F и Ad.26.RSV.F/Ad35.RSV.F	[54]
Ad26.RSV.F и Ad35.RSV.F («Janssen Vaccines», Нидерланды)	Аденовирусы 26-го и 35-го типов, в состав которых входит ген, кодирующий F, в конформации pre-F (нет адьюванта)	Хлопковые крысы (в.м.)	Двукратная иммунизация вариантами Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F по схеме гомологичного и гетерологичного прайм-буста в дозе 10^{10} вирусных частиц индуцировала высокие уровни вируснейтрализующих антител и полностью защищала животных от репликации РСВ в респираторном тракте, не вызывая патологических изменений в тканях лёгких после челленджа. Была оценена возможность снижения дозы вакцины, для чего животных однократно иммунизировали Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F в дозах 10^6 – 10^8 вирусных частиц и подвергали заражению РСВ A2 спустя 7 нед. Все иммунизированные животные были полностью защищены от размножения вируса в лёгких, а репликация в носгах была значительно снижена во всех группах по сравнению с контролем. Баллы гистопатологии в обеих группах были одинаковы и не отличались от группы наивного контроля. Длительность и кросс-протективный потенциал вакцины оценивали путём двукратной иммунизации крыс по схеме гомологичного и гетерологичного прайм-буста кандидатами, взятыми в дозах 10^8 и 10^{10} вирусных частиц, и заражением животных РСВ A2 либо РСВ B15/9 через 30-й неделе после иммунизации. Челлендж-вирусы не реплицировались в лёгких во всех вакцинных группах, при этом комбинация Ad26.RSV.F/Ad.35.RSV.F (10^{10} вирусных частиц) лучше защищала животных от репликации РСВ B15/9 в носгах. В отличие от ФИ-РСВ, исследуемые вакцины не вызывали гистопатологических изменений в тканях лёгких после челленджа	[54]
		Хлопковые крысы (в.м.)	Сравнивали защитную эффективность однократной иммунизации Ad26.RSV.preF в дозе 10^5 – 10^8 вирусных частиц и двукратной иммунизации белком RSV.preF. На 49-й день крысам вводили РСВ A2 в дозе 10^5 БОЕ. В группе Ad26.RSV.preF челлендж-вирус не размножился в носгах и лёгких в отличие от группы RSV.preF. Была установлена корреляция между выработкой нейтрализующих антител и защитой животных от заражения РСВ	[116]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адъювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
VXA-RSV f пероральная («Vaxart», США)	Ad-RSVF — аденовирус 5-го типа, который содержит ген, кодирующий полноразмерный F белок (нет адъюванта)	Хлопковые крысы (п.о.)	Двукратная иммунизация крыс Ad-RSVF в разных дозах (10^8 – 10^{10} БОЕ) защитила крыс от заражения РСВ А2 в дозе 1×10^5 БОЕ на 70-й день: вирус не размножился в носгах и лёгких в группе, где доза вакцины была больше (дозозависимый защитный эффект иммунизации). Уровень гистопатологии в группе Ad-RSVF был намного ниже, чем в группе ФИ-РСВ. В группе Ad-RSVF уровень индукции провоспалительных цитокинов был минимальным	[117]
ChAd155-RSV GS («GSK», Великобритания)	Аденовирус шимпанзе, содержащий гены, кодирующие F-белок (дефекция трансмембранной области), N, M2-1 (нет адъюванта)	Телята (в.м.)	Телят иммунизировали ChAd155-RSV в дозе 5×10^{10} . Челлендж проводили спустя короткий (4 нед) или длинный (16 нед) период после иммунизации. В отличие от иммунизированных ChAd155-RSV, у неиммунизированных телят наблюдались лихорадка, высокая температура, респираторный дистресс-синдром, высокий уровень лёгочной консолидации и гистопатологические изменения в лёгочной ткани после челленджа. Когда челлендж проводили спустя 4 нед, репликация вируса в БАЛ и назофарингеальных смывах у неиммунизированных была в 500–1000 раз и в 10 раз выше соответственно, чем в группе ChAd155-RSV. В случае, когда челлендж проводили на 16-й неделе, в группах ChAd155-RSV и PBS пиковые значения вирусного титра в БАЛ и носовых смывах были примерно одинаковыми, но вирусный клиренс наступал раньше. Для установления роли предсуществующего иммунитета к РСВ телят кормили молозивом с содержанием антител к РСВ до иммунизации ChAd155-RSV или PBS. В группе ChAd155-RSV у телят с антителами к РСВ отсутствовали признаки РСИ (недомогание, лихорадка, учащение дыхания) в отличие от группы PBS, где у телят были антитела к РСВ. В группах ChAd155-RSV с антителами к РСВ челлендж-вирус размножился в 100 и 10 раз меньше в БАЛ и носовой полости, чем в группе PBS	[118]
SeV/RSV (NIAID, США)	Вирус Сендай (вирус парагриппа 1-го типа), который содержит ген, кодирующий полноразмерный F (РСВ) (нет адъюванта)	Африканские зелёные мартышки (и.н. + и.т.)	SeV/RSV был аттенуированным при введении в дозе 2×10^6 ЭИД ₅₀ . Вирус не выделялся в носовых смывах, был в 1000 раз более ослабленным, чем b/h PIV-3 RSV F2. На 28-й день мартышек заражали RSV А2 в дозе $1,4 \times 10^6$ БОЕ. Челлендж-вирус выделялся в верхних дыхательных путях в группе SeV/RSV в меньшей степени по сравнению с контролем и не выделялся из БАЛ. В группе SeV/RSV после челленджа не наблюдались побочные эффекты. В срезах лёгких были обнаружены небольшие очаги лимфогистиоцитарного воспаления вокруг терминальных и респираторных бронхиол	[119]
гBCG-N-hRSV (Католический университет Чили, Чили)	Бактерия <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> (BCG), которая содержит ген, кодирующий N-белок РСВ (нет адъюванта)	Мыши BALB/c (п.к.)	Мышам вводили гBCG-N-hRSV либо BCG-WT в дозе 3×10^5 БОЕ. Через 3 нед мышей заражали РСВ в дозе 1×10^7 БОЕ. В группах BCG-WT и неиммунизированных мышей потеря веса составила примерно 10%, тогда как в группе гBCG-N-hRSV потеря веса была незначительной. В группе гBCG-N-hRSV вирусная нагрузка в БАЛ была меньше в 7 и 300 раз, чем в группах BCG-WT и неиммунизированных мышей соответственно. В гистологических срезах лёгких в группе гBCG-N-hRSV воспаление было выражено в меньшей степени, чем в группах неиммунизированных мышей и BCG-WT. В исследовании долговременной защиты челлендж проводили спустя 50 дней после иммунизации. В группе гBCG-N-hRSV мыши меньше теряли вес по сравнению с другими группами, количество инфильтрирующих клеток в БАЛ и вирусная нагрузка были ниже, чем в группах неиммунизированных мышей и BCG-WT	[120]
		Мыши BALB/c (п.к.)	Мышей иммунизировали BCG-N, BCG-M2 в дозе 1×10^8 БОЕ. Мышей заражали интраназально РСВ в дозе 1×10^7 БОЕ. После челленджа мыши значительно теряли вес в группах контроля (BCG-WT, UV-RSV, BCG-OVA). В группах BCG-N и BCG-M2 потеря веса не происходила. Компьютерная томография продемонстрировала отсутствие признаков пневмонии и воспаления в лёгочной ткани в группах BCG-N, BCG-M2, в отличие от группы неиммунизированных мышей после челленджа. После челленджа в группах BCG-N, BCG-M2 не фиксировали активную инфильтрацию нейтрофилов в БАЛ по сравнению с неиммунизированными мышами. После челленджа группам BCG-N и BCG-M2 присваивали низкие баллы лёгочной гистопатологии, эквивалентные группе наивного контроля, которую не заражали РСВ. Установили, что иммунизация	[121]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адьювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
			BCG-N и BCG-M2 стимулирует прежде всего Т-клеточный иммунитет: активируются Т-клетки с Th1-подобным паттерном секреции цитокинов	
		Мыши BALB/c (с дефицитом RAG-1) (п.к.)	Мышей иммунизировали 2 раза с интервалом 10 дней BCG-N, BCG-M2, BCG-WT в дозе 1×10^8 БОЕ. Через 21 день мышей заражали РСВ в дозе 1×10^7 БОЕ. Мыши из группы BCG-N активно теряли вес (наравне с неиммунизированными мышами, заражёнными РСВ). После заражения РСВ в группах BCG-N и BCG-WT в БАЛ было большое количество инфильтрующих клеток — нейтрофилов и эозинофилов. На 6-й день после челленджа вирусная нагрузка в лёгких во всех группах была практически одинаковая. На 12-й день снижение РС вирусной нагрузки наблюдалось в группе мышей BALB/c (не RAG-1). Эти результаты свидетельствуют о том, что для РСВ клиренса необходимы Т-клетки, а механизмов врождённого иммунитета недостаточно для защиты от РСИ	[122]
		Телята голштинской породы (п.к.)	Телятам вводили rBCG-N-hRSV либо WT-BCG в дозе 10^6 БОЕ 2 раза с интервалом 2 нед. Через 2 нед телят заражали РСВ в дозе 10^6 ТЦИД ₅₀ . У всех телят развивались признаки РСИ (лихорадка, вялость, выделения из носа и глаз, лёгкая одышка), однако баллы по оценке клинического состояния в группах rBCG-N-hRSV и WT-BCG были ниже, чем у неиммунизированных. Не было различий в баллах по степени поражения лёгочной ткани в группах rBCG-N-hRSV, WT-BCG и неиммунизированных телят после челленджа и отсутствовали признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания	[123]
MVA-F и MVA-G (National Heart and Lung Institute, Великобритания) (Institute of Molecular Virology, Германия)	Вектор MVA, несущий гены, кодирующие F- и G-белки РСВ	Мыши BALB/c (и.п.)	Двукратная иммунизация мышей вариантами MVA-F и MVA-G в дозе 10^8 инфекционных единиц приводила к образованию выраженного гуморального и Т-клеточного иммунитета к РСВ. Заражение иммунизированных мышей РСВ в дозе $1,2 \times 10^6$ БОЕ показало ускоренную элиминацию вируса в группах MVA-F и MVA-G по сравнению с группой мышей, иммунизированных вектором MVA. Признаки эозинофилии после челленджа отсутствовали в группах MVA-F и wtMVA и были небольшими в группе MVA-G. Тем не менее в группе MVA-F был выражен лимфоцитоз (~50%) по сравнению с MVA-G (~20%). В группе MVA-G было больше полиморфноядерных клеток, что сопоставимо с группой ФИ-РСВ. После челленджа мыши активно теряли вес в группах MVA-G (до 15%), MVA-F (~12%) и ФИ-РСВ (~10%) по сравнению с группой контрольных животных после РСВ-челленджа, что свидетельствует об обострении протекания заболевания после иммунизации и заражения РСВ	[124]
rVV-G и rVV-F (University of Pittsburgh School of Medicine, США)	Вирусы корьей оспы, содержащие гены, кодирующие F- или G-белок в разных формах: rVVGsol (растворимая, секреторируемая форма), rVVGmet (форма, заякоренная в мембране), rVVG (обе формы)	Мыши BALB/c (в.б., скар.)	Иммунизация мышей rVVF, rVVG и rVVGmet приводила к индукции высоких уровней антител, независимо от способа введения. В группе rVVGsol уровень РСВ-специфических антител был в ~550 раз выше при в.б. введении, чем при иммунизации посредством скарификации. При заражении иммунизированных мышей штаммом РСВ A2 вирус не выделялся из лёгких в группах rVVF, rVVG, rVVGmet и rVVGsol. При иммунизации посредством скарификации в группах rVVG и rVVGsol наблюдали повышение количества эозинофилов в БАЛ после челленджа. В группе rVVGmet эозинофилов было в 10 раз, чем в группах rVVG и rVVGsol. При в.б. введении эозинофилы в БАЛ не обнаруживались. Способ введения вакцины влиял на развитие лёгочной патологии	[125]
LAIV + NA/RSV и LAIV + NS1/RSV (Институт экспериментальной медицины, Россия)	Рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие полиэпитопную Т-клеточную кассету РСВ M2-1 (70-101+114-146)	Мыши BALB/c (и.н.)	Мышей иммунизировали 2 раза с интервалом 3 нед вакцинными вариантами LAIV + NA/RSV или LAIV + NS1/RSV в дозе 10^6 ЭИД ₅₀ на мышь. Спустя 3 нед после 2-й иммунизации мышей заражали интраназально РСВ штаммом A2 в дозе 2×10^5 БОЕ/особь. Обнаружено, что РСВ детектировался на незначительном уровне в группах LAIV + NA/RSV и LAIV + NS1/RSV, в отличие от группы PBS и LAIV в лёгких, собранных на 5-е сутки. В отличие от группы ФИ-РСВ, вакцинные варианты LAIV + NA/RSV и LAIV + NS1/RSV не вызывали лёгочную эозинофилию и лёгочную патологию после заражения РСВ	[126]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адъювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
LAIV + NA/RSV и LAIV + NS1/RSV (Институт экспериментальной медицины, Россия)	Рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие полиэпитопную Т-клеточную кассету PCB M2-1 (70-101+114-146)	Мыши BALB/c (и.н.)	Мышей иммунизировали 2 раза с интервалом 3 нед вакцинными вариантами LAIV + NA/RSV или LAIV + NS1/RSV в дозе 10^6 ЭИД ₅₀ . Спустя 7 дней после 2-й иммунизации у мышей собирали лёгкие для идентификации субпопуляций резидентных Т-клеток. Обнаружено, что иммунизация LAIV + NA/RSV или LAIV + NS1/RSV приводит к выработке высоких уровней тканерезидентных Т-клеток памяти к встроенному иммунодоминантному CD8 ⁺ -Т-клеточному эпитопу. При этом уровни грипп-специфических Т-клеток памяти CD8 ⁺ -Т-клеток в группах ЖГВ + NA/PCB и ЖГВ + NS1/PCB были выше, чем в группе ЖГВ	[43]
LAIV-HA + G-RSV и LAIV-HA + A-RSV (Институт экспериментальной медицины, Россия)	Встраивание целевого фрагмента F ₂₄₃₋₂₉₄ PCB в молекулу HA, который является целевым фрагментом ЖГВ	Мыши BALB/c (и.н.)	Векторные вакцинные кандидаты отличались составом химерного гена HA + PCB: PCB-вставка соединялась с субъединицей HA1 с помощью линкера AAAPGAA (A) либо G ₄ SG ₄ S (G). Мышей иммунизировали 2 раза с интервалом 3 нед вакцинными вариантами LAIV-HA + G-RSV или LAIV-HA + A-RSV в дозе 10^6 ЭИД ₅₀ . Спустя 3 нед после 2-й иммунизации мышью заражали интраназально PCB штаммом A2 в дозе 5×10^5 БОЕ/особь. На 5-е сутки после заражения оценивали степень репликации PCB в лёгочной ткани. Иммунизация LAIV-HA + G-RSV и LAIV-HA + A-RSV не смогла предотвратить развитие РСИ. Тем не менее была зафиксирована достоверная разница между значениями титра вируса в группе ЖГВ-HA + G-PCB по сравнению с PBS. Оценка состояния эпителия бронхов мышью выявила, что в группе ЖГВ-HA + G-PCB степень повреждения была достоверно ниже по сравнению с группой ЖГВ, тогда как для вакцинного варианта ЖГВ-HA + A-PCB достоверной разницы не выявлено. Гистопатологическая оценка сегментов лёгких мышью после заражения PCB показала высокую степень защиты в группах, иммунизированных векторными вакцинами ЖГВ-HA + A-PCB и ЖГВ-HA + G-PCB, в отличие от ФИ-PCB	[45]
PR8-NS-F, PR8-sF-NS (НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Россия)	Вирус гриппа A/PR/8/34 с усечённым до 124-й аминокислоты (NS ₁₂₄) в состав которой включена иммуногенная кассета F-белка (фрагмент F ₂₄₈₋₂₉₀ и F ₄₀₉₋₄₅₁) с добавлением или без сигнального пептида IgGk (для внеклеточной доставки)	Мыши BALB/c (и.н.)	Мышей однократно иммунизировали вакцинными кандидатами NS-2AF (содержит сайт 2A на N-конце PCB-вставки), NS-2AsF (NS-2AF, который содержит IgGk), NS-F (укороченный NS1), sF-NS (NS-F, который содержит IgGk) в дозе $6 \log_{10}$ ТЦИД ₅₀ . На 28-й день заражали PCB A2 в дозе $6 \log_{10}$ БОЕ. После челленджа уровни вирусной нагрузки у иммунизированных мышью были на $1,5 \log_{10}$ БОЕ/мл и $2,26 \log_{10}$ БОЕ/мл меньше в группах NS-2AsF и NS-2AF соответственно по сравнению с группой неиммунизированных мышью. Во 2-м эксперименте в группе sF-NS вирусная нагрузка после челленджа была на $2 \log_{10}$ БОЕ/мл меньше, чем в группе неиммунизированных мышью. В группе NS-F репродукция челлендж-вируса была сопоставима с группой неиммунизированных мышью. У мышью из группы NS-2AsF наблюдались низкие показатели воспаления и минимальная лимфоцитарная инфильтрация. Минимальные изменения в морфологии лёгочной ткани наблюдались в группе sF-NS	[46]
Субъединичные вакцины				
DS-Cav1 (NIAID, США)	Растворимая версия F-белка в конформации pre-F с антигенным сайтом Ø (poly I:C)	Мыши CB6F1/J (♀BALB/cJ + ♂C57BL/6J (в.м.))	Мышам вводили PCB pre-F в разных вариантах (DS, Cav1, TriC, DS-Cav1) в дозе 10 мкг с интервалом 3 нед. Во всех группах в сыворотках крови титр нейтрализующих антител против PCB был в 4 раза выше, чем в группе PCB post-F, и в 20 раз выше установленного защитного порога	[127]
	Растворимая версия F-белка в конформации pre-F с антигенным сайтом Ø (poly I:C)	Макаки резус (в.м.)	Макакам вводили PCB pre-F в разных вариантах (DS, DS-Cav1) в дозе 50 мкг с интервалом 4 нед. В группах DS и DS-Cav1 титр нейтрализующих антител был в 5–10 раз больше в сыворотках, чем в группе PCB post-F. К 8-й неделе в группе DS-Cav1 титр нейтрализующих антител был выше, чем в группе DS, и в 60 раз выше, чем в группе PCB post-F	[127]
	Растворимая версия F-белка в конформа-	Африканские мартышки	Мартышек иммунизировали трижды DS-Cav1 (125 мкг) в разных объёмах с разными адъювантами. На 70-й день животных заражали PCB в дозе $2 \times 5,5 \log_{10}$ БОЕ. В группе DS-Cav1 (введён в объёме 0,25 мл) значение пиковых PCB титров было на $3 \log_{10}$	[128]

Продолжение табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адъювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
	ции pre-F с антигенным сайтом \emptyset (наноземульсия, Adju-Phos)		и $2 \log_{10}$ ниже в лёгких и носовой полости, чем в контрольной группе. Была обнаружена корреляция между защитным эффектом в носовой полости и стимуляцией IgA, а также защитой в лёгких и Fc-опосредованной антительной активностью	
	Растворимая версия F-белка в конформации pre-F с антигенным сайтом \emptyset (Алюм, Poly I:C, Poly (I:LC), MPLA, SAS, Alum + MPLA, SAS + Carbopol, Adjuvex, AddaVax)	Мыши CB6F1/J (в.м.)	Мышам вводили RSV F DS-Cav1 в комбинации с разными адъювантами 2 раза с интервалом 3 нед в дозе 10 мкг. Во всех группах не наблюдали побочные эффекты. В группах RSV F DS-Cav1 с адъювантами SAS + Carbopol наблюдались самые высокие титры нейтрализующих антител, которые были в 15 раз выше, чем в группах Алюм + MPLA и Alum, и в 5 раз выше, чем в Poly (I:C). В группах с MPLA, Alum + MPLA, AddaVax и Adjuvex фиксировали IgG1-иммунный ответ в сыворотках. Вакцинация в группах с комбинацией адъювантов SAS, SAS + Carbopol, Poly (I:C) и Poly (I:LC) индуцировала IgG1- и IgG2а-иммунный ответ. Титр нейтрализующих антител в группе RSV F DS-Cav1 без адъюванта был ниже защитного порогового значения	[129]
	Растворимая версия F-белка в конформации pre-F с антигенным сайтом \emptyset (ISA 71 VG, либо ISA 71 VG + Карбопол)	Телята (в.м.)	Телятам вводили bRSV F DS-Cav1 с разными адъювантами 2 раза с интервалом на 4-й неделе в дозе 50 мкг. Разницы между нейтрализующими титрами в группах с адъювантом ISA 71 VG и ISA 71 VG + Carbopol не наблюдали. Эта комбинация адъювантов значительно усиливает иммунный ответ у крупного рогатого скота	
DPX-RSV («Immunovaccine», США)	Внеклеточный домен SH белка PCB (подтип А) — SHe, включённый в платформу на масляной основе DepoVax (Pam3CSK4 и алюмин)	Мыши CD-1 (в.м.)	Мышам вводили SHe в дозе 25 мкл, смешанный с алюмином (Алюм-SHe), либо в составе DPX (DPX-SHe) один либо 2 раза (с интервалом 3 нед). У мышей, иммунизированных 1 или 2 дозами DPX-SHe, титр IgG-антител был выше, чем в группе Алюм-SHe, и сохранялся в течение 20 нед после иммунизации. Иммунизация Алюм-SHe не приводила к развитию побочных реакций (снижение активности, цианоз, снижение температуры тела, сгорбленность), в отличие от группы DPX-SHe. В группе Алюм-SHe наблюдалось снижение белков комплимента (C3 и C4) и проявление реакций гиперчувствительности, в отличие от DPX-SHe	[130]
BARS13 (Advaccine) («Biopharmaceuticals Suzhou Co», Китай)	BARS13 (или CSA+G состоит из CSA — циклоспорин А (может индуцировать Treg) и рекомбинантного G-PCB (укороченный)	Мыши BALB/c (в.м.)	Мышам вводили BARS13 в дозе 10 мкг 2 раза с интервалом 2 нед. Через 2 нед мышам заражали PCB A2 в дозе 5×10^7 БОЕ. В группе BARS13 вирусная нагрузка в лёгких после челленджа была в 10 раз ниже, чем в группах ФИ-PCB и G-белка. В группе BARS13 динамика изменения веса у мышей была сопоставима с группой мышам, которых не заражали PCB. В лёгких мышам из группы BARS13 отсутствовали признаки гистопатологии. Защитный эффект в группе BARS13 объясняли вкладом Treg-клеток, которые были высоки в БАЛ и лимфоузлах после челленджа	[131]
			BARS13 модифицировали включением в состав вакцины, вводили с PCB pre-F. Мышам иммунизировали по 10 мкг BARS13 либо BARS13 + pre-F 2 раза с интервалом 2 нед. Через 2 нед мышам заражали PCB в дозе 2×10^6 БОЕ. Уровни сывороточных IgG-антител были выше в группе BARS13 + pre-F, чем BARS13. В группе BARS13 + pre-F были высокие уровни Treg-клеток по сравнению с группами ФИ-PCB и pre-F. В группе BARS13 + pre-F уровень нейтрализующих антител был выше в 6 раз, чем в группе BARS13. После челленджа PC нагрузка в лёгочной ткани в группе BARS13 + pre-F была на 10% меньше, чем в группе BARS13. Степень лёгочного воспаления в группе BARS13 + pre-F была минимальной	[132]
RSVPre-F3/ (GSK3844766A «GlaxoSmith-Kline», Великобритания)	Пептид F, стабилизированный в конформации «до слияния» (AS01)	Кролики (в.м.)	Кроликам вводили RSVPre-F3 в одиночку либо в комбинации с вакциной Boostrix трижды. В группах RSVPreF3, RSVPreF3/AS01, RSVPreF3 + Boostrix титры IgG-антител к RSVPre-F3 были высокими. Иммунизация RSVPre-F3 не оказывала влияния на массу тела, зрение, кожные покровы, аппетит и температуру тела. Клинико-патологические изменения (увеличение лейкоцитов, нейтрофилов, фибриногена и концентрации С-реактивного белка,	[133]

Окончание табл. 1

Вакцина (разработчик)	Состав вакцины (адъювант)	Животные (путь введения)	Исследование и результаты	Источник
PCB-F (NIAID, США)	Очищенный F-белок PCB		снижение альбумина) фиксировались на следующий день после введения вакцины, и показатели приходили в норму в течение 4 нед. Кроликам вводили RSVPre-F3 за несколько недель до спаривания, во время беременности и во время лактации. Наблюдался пассивный перенос антител от иммунизированных самок крольчатам	
		Крысы (в.м.)	Крысам вводили RSVPre-F3 за несколько недель до спаривания, во время беременности и лактации. У большинства крыс IgG к RSVPre-F3 обнаруживались перед спариванием (31/48), во время беременности (14/31) и в период лактации (16/31), и антитела передавались потомству. Иммунизация самок RSVPre-F3 не влияла на фертильность, беременность, лактацию, выживаемость и к изменениям внешних признаков висцерального и скелетного развития у потомства	
		Хлопковые крысы (в.м.)	Двукратная иммунизация белком в дозах 0,05–5,00 мкг приводила к образованию высоких уровней PCB F-специфических антител, которые циркулировали в течение 6 мес после вакцинации, однако их нейтрализующая активность была низкой. Заражение крыс PCB через 3 мес после иммунизации показало снижение вирусной нагрузки в лёгких в группе PCB-F в 100 раз по сравнению с контрольной группой. Через 6 мес после иммунизации защита от PCB практически отсутствовала — в группах ФИ-PCB и PCB-F. В группе PCB F (5 мкг) наблюдалось состояние вакцин-индуцированного усиления заболевания после PCB челленджа, сопоставимое с ФИ-PCB	[134]
Вакцины на основе вирусоподобных частиц				
V306-SVLP («Вирометикс», Швейцария)	Миметик пептида, который связывается с мотавизумабом V-306 (алюм для дозы 15 мкг V-306)	Мыши BALB/c (в.м.)	Мышам вводили V306-SVLP в разных дозах дважды с интервалом 3 нед. На 31-й день мышей заражали PCB в дозе 10 ⁶ БОЕ. Иммунизация V306-SVLP стимулировала выработку нейтрализующих антител к PCB. На 5-е сутки челлендж вирус не репродуцировался в группах V306-SVLP (50–300 мкг), в отличие от PBS, ФИ-PCB и группы V306-SVLP (15 мкг). Во всех группах V306-SVLP не наблюдалось гистопатологических изменений в лёгких, в отличие от ФИ-PCB	
		Кролики (в.м.)	Кроликам вводили V306-SVLP в дозе 140 мкг трижды с интервалом в 28 дней. Наблюдись высокие уровни нейтрализующих антител к 8 разным штаммам PCB подтипов А и В	[135]
		Хлопковые крысы (в.м.)	Хлопковым крысам вводили препарат моноклональных антител 10D11 анти-V-306 и паливизумаб в разных дозах. Через 1 сут крыс заражали PCB в дозе 10 ⁴ БОЕ. Высокие титры PCB в лёгких наблюдались в группе PBS. В группах 10D11 и паливизумаба наблюдалось дозозависимое снижение репликации. Вакцинация V-306 стимулировала выработку антител с паливизумаб-подобными свойствами	
VX-121 («Икосавакс», США)	Наночастица I53-50 с несколькими тримерами DS-Cav1 (тример F, стабилизированный в конформации «до слияния») на поверхности (AddaVax)	Мыши BALB/c (п.к.)	Мышам вводили DS Cav1-I53-50 либо DS Cav1 в дозе 5 мкг трижды с интервалом 2 нед. DS Cav1-I53-50 индуцировала более сильный антиген-специфичный и нейтрализующий иммунный ответ. Иммунизация DS Cav1-I53-50 индуцировала образование фолликулярных Т-хелперов у иммунизированных мышей в 5,3 раза выше, чем DS Cav1. Поскольку фолликулярные Т-хелперы контролируют пролиферацию В-лимфоцитов в фолликулах лимфоидных органов, то количество В-клеток в лимфоузлах мышей из группы DS Cav1-I53-50 было больше, чем в группе DS Cav1	[136]
		Макаки (индийские) (п.к.)	Макак иммунизировали дважды DS-Cav1 (50 мкг) и DS-Cav1-I53-50 (96 мкг) с интервалом 28 дней. DS-Cav1-I53-50 индуцировал в 5 раз сильнее выработку антиген-специфических в 25 раз интенсивнее нейтрализующих антител, чем DS-Cav1. Установлено, что специфические антитела в сыворотках макак направлены на F-белок PCB в конформации pre-F	

Примечание. и.н. — интраназально; и.т. — интратрахеально; в.м. — внутримышечно; п.к. — подкожно; п.о. — перорально; в.б. — внутрибрюшинно; скар. — скарификация.

Таблица 2. Обзор вакцин, находящихся на разных стадиях клинических испытаний

Вакцина (разработчик)	Фаза клинических испытаний (целевая группа)	Период	№ испытания в реестре	Источник
Рекомбинантные векторные вакцины				
RSV001 (PanAd3-RSV и MVA-RSV) («ReiThera», Италия)	Фаза I (В.; П.)	2013–2015	NCT01805921	Да [48, 49]
VXA-RSV f («Vaxart», США)	Фаза I (В.)	2016–2018	NCT02830932	Нет
ChAd155-RSV GS («GSK», Великобритания)	Фаза I (В.)	2016–2017	NCT02491463	Да [58]
	Фаза I/II (141)	2016–2021	NCT02927873	Да [60]
	Фаза I/II (♀)	2018–2022	NCT03636906	Нет
	Фаза II (В. ♀)	2015–2018	NCT02360475	Да [138]
MVA-BN RSV («Bavarian Nordic BN», Дания)	Фаза I (В. П.)	2015–2016	NCT02419391	Да [46]
	Фаза I (В.)	2016–2018	NCT02864628	Да [46]
	Фаза II (П.)	2016–2018	NCT02873286	Да [47]
	Фаза 2a (В.)	2021–2021	NCT04752644	Да [139]
	Фаза III (П.)	2022–2024	NCT05238025	Да [140]
SeV/RSV (NIAID, США)	Фаза I (В.)	2018–2019	NCT03473002	Да [65]
Ad26.RSV.preF («Janssen Vaccines & Prevention B.V.», Нидерланды)	Фаза I (В.; П.)	2016–2019	NCT02926430	Да [141]
	Фаза I (Д)	2022	NCT03606512	Да [57]
	Фаза I/2a (В.; Д)	2017–2022	NCT03303625	Да [57]
Ad26.RSV.preF («Janssen Vaccines & Prevention B.V.», Нидерланды)	Фаза II (П.)	2017–2021	NCT03339713	Да [56]
	Фаза II (В.; П.)	2017–2021	NCT03334695	Да [142]
rBCG-N-hRSV (Католический университет Чили, Чили)	Фаза I (В. ♂)	2017–2018	NCT03213405	Да [143]
RSV/Flu-01E (НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Россия)	Фаза I (В.; П.)	2022–2023	РКИ 736 (NCT05970744)	Нет
	Фаза II (П.)	2023–2024	РКИ 694	Нет
Ad26.RSV.FA2, Ad35.RSV.FA2 («CruceCell Holland BV», Нидерланды)	Фаза I (В.)	2015–2016	NCT02561871	Нет
	Фаза I (В.)	2015–2016	NCT02440035	Нет
Живые аттенуированные вакцины				
MV-012–968 («Meissa», США)	Фаза I (В.)	2020–2020	NCT04227210	Нет
	Фаза I (141)	2021–2023	NCT04909021	Нет
RSV MEDI ΔM2-2 (NIAID/NIH, MedImmune («AstraZeneca»), США)	Фаза I (141)	2011–2015	NCT01459198	Да [75]
RSV cps2 (NIAID/NIH, MedImmune («AstraZeneca»), США)	Фаза I (141)	2013–2015	NCT01968083	Да [73]
	Фаза I (141)	2013–2016	NCT01852266	
RSV LID ΔM2-2, NIAID («Sanofi Pasteur»)	Фаза I (141)	2014–2016	NCT02040831	[76]
	Фаза I (141)	2014–2015	NCT02237209	[76]
RSV LID/ΔM2-2/1030s (NIAID, США, «Sanofi Pasteur», Франция)	Фаза I (141)	2020–2023	NCT04520659	Нет
	Фаза I (141)	2016–2018	NCT02952339	Да [78]
	Фаза I (141)	2015–2017	NCT02794870	Да [78]
RSV LID cp ΔM2-2 (NIAID, США)	Фаза I (141)	2015–2018	NCT02890381	Да [144]
	Фаза I (141)	2015–2018	NCT02948127	Да [144]
RSV D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (NIAID, США)	Фаза I (141)	2017–2018	NCT03102034	Да [145]
	Фаза I (141)	2017–2018	NCT03099291	Да [145]
RSV ΔNS2/Δ1313/11314L (NIAID, США)	Фаза I (141)	2013–2018	NCT01893554	Да [82]
	Фаза I (141)	2017–2022	NCT03227029	Да [146]
RSV 6120/ΔNS2/1030s (NIAID, США)	Фаза I (141)	2017–2022	NCT03387137	Нет
RSV 6120/ΔNS1 и RSV 6120/F1/G2/ΔNS1	Фаза I (141)	2018–2023	NCT03596801	Нет
RSV ΔNS2/Δ1313/11314L; RSV 6120/ΔNS2/1030s; RSV 276, (NIAID, США)	Фаза I и II (141)	2019–2022	NCT03916185	Нет
RSV ΔNS2/Δ1313/11314L; RSV 276 (NIAID, США)	Фаза I и II (141)	2017–2020	NCT03422237	Да [146]
RSV D46 cpΔM2-2, (NIAID, США)	Фаза I (141)	2015–2019	NCT02601612	Нет
MEDI-559, (MedImmune) («AstraZeneca», США)	Фаза I и II (141)	2008–2011	NCT00767416	Да [72]
Субъединичные рекомбинантные вакцины				
GSK3888550A RSVPreF3 («GSK», Великобритания)	Фаза I (В. ♀)	2018–2019	NCT03674177	Да [147]
	Фаза II (В. ♀)	2019–2022	NCT04126213	Да [148]
	Фаза II (В. ♀)	2019–2020	NCT04138056	Нет

Окончание табл. 1

Вакцина (разработчик)	Фаза клинических испытаний (целевая группа)	Период	№ испытания в реестре	Источник
	Фаза III (В. ♀)	2020–2023	NCT04605159	Нет
GSK3844766A RSVPreF3, Arexvy («GSK», Великобритания)	Фаза I/II (В., П.)	2019–2021	NCT03814590	Да [91]
	Фаза I (П.)	2019–2022	NCT04090658	Да [90]
	Фаза II (П.)	2020–2021	NCT04657198	Да [92]
	Фаза III (П.)	2021–2024	NCT04886596	Да [94, 149]
	Фаза III (В., П.)	2023–наст. вр.	NCT05921903	Нет
	Фаза III (П.)	2021–наст. вр.	NCT04732871	Да [93]
	Фаза III (П.)	2021–2022	NCT04841577	Да [150]
	Фаза III (П.)	2021–2022	NCT05059301	Да [151]
	Фаза III (П.)	2022–2023	NCT05559476	Да [152]
	Фаза III (П.)	2022–2023	NCT05568797	Да [153]
	Фаза III (П.)	2023–2024	NCT05590403	Да [154]
	Фаза III (П.)	2023–2024	NCT05879107	Нет
RSVPreF3 («GSK», Великобритания)	Фаза I (В.)	2014–2018	NCT02298179	Да [155]
DPX-RSV(A)(Immunovaccine, США и Университет Далхаузи, Канада)	Фаза I (В.)	2015–2017	NCT02472548	Да [89]
RSV F DS-Cav1 (NIH/NIAID/VRC, США)	Фаза I (В.)	2017–2020	NCT03049488	Да [86]
RSVpreF Abrysvo («Pfizer», США)	Фаза II (В. ♀)	2019–2019	NCT04071158	Да [156]
	Фаза I/II (В., П.)	2018–2021	NCT03529773	Да [95, 157]
	Фаза 2b (В. ♀)	2019–2022	NCT04032093	Да [158]
	Фаза II (П.)	2018–2021	NCT03572062	Да [159]
	Фаза III (Д., В. ♀)	2020–наст. вр.	NCT04424316	Да [160]
	Фаза Ib (П.)	2023–2023	NCT05788237	Нет
	Фаза II (В. ♀)	2019–2019	NCT04071158	Да [156]
	Фаза II (В.)	2020–2021	NCT04785612	Да [161]
	Фаза III (П.)	2021–наст. вр.	NCT05035212	Нет
	Фаза III (В.)	2021–2022	NCT05096208	Да [162]
	Фаза III (П.)	2022–2022	NCT05301322	Да [163]
	Фаза III (В., П.)	2023–2024	NCT05842967	Нет
RSV F vaccine (RSVpreF) («Pfizer», США)	Фаза I/II (П.)	2018–2020	NCT03572062	Да [159]
BARS13, (Advaccine) (Suzhou) «Biopharmaceuticals Co., Ltd», Китай)	Фаза I (В.)	2019–2019	NCT04851977	Да [164]
	Фаза II (В., П.)	2020–2023	NCT04681833	Нет
	Фаза II (В.)	2018–2019	ACTRN12618000948291	Нет
Вакцины на основе вирусоподобных частиц				
V306-SVLP («Virometix AG», Швейцария)	Фаза I (В. ♀)	2020–2022	NCT04519073	Да [105]
SynGEM («Mucosis B.V.», Нидерланды)	Фаза I (В. ♀♂)	2016–2017	NCT02958540	Да [104]
RSV F (ResVax) («Novavax», США)	Фаза I (В.)	2010–2011	NCT01290419	Да [165]
	Фаза II (В. ♀)	2012–2013	NCT01704365	Да [166]
	Фаза II (В. ♀)	2013–2014	NCT01960686	Да [167]
	Фаза II (В. ♀)	2014–2016	NCT02247726	Да [100]
	Фаза III (В. ♀)	2015–2020	NCT02624947	Да [102]
RSV F наночастица, («Novavax», США)	Фаза I (П.)	2012–2014	NCT01709019	Да [168]
	Фаза II (П.)	2014–2016	NCT02266628	Нет
	Фаза II (П.)	2015–2016	NCT02593071	Нет
	Фаза III (П.)	2015–2016	NCT02608502	Нет
	Фаза II (П.)	2017–2018	NCT03026348	Нет
	Фаза I (141)	2014–2016	NCT02296463	Нет
Вакцины на основе матричной РНК				
mRNA-1345	Фаза I (Д.)	2023–наст. вр.	NCT05743881	Нет
	Фаза I (Д., В., П.)	2020–2024	NCT04528719	Да [35]
	Фаза II (В. ♀)	2023–наст. вр.	NCT06143046	Нет
	Фаза II–III (П.)	2021–наст. вр.	NCT05127434	Да [41, 169]
RSV mRNA LNP CL-0059; LNP CL-0137	Фаза I–II (В., П.)	2022–наст. вр.	NCT05639894	Нет

Примечание. Д. — дети; П. — люди старше 50 лет; В. — взрослые (от 18 лет, верхний порог различный).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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)
- 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)
- Walsh E.E., Falsey A.R. Respiratory syncytial virus infection in adult populations. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2012;12(2):98–102. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152612800100116>
- Hall C.B., Walsh E.E., Long C.E., Schnabel K.C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1991;163(4):693–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/163.4.693>
- Rima B., Collins P., Easton A., et al. ICTV virus taxonomy profile: Pneumoviridae. *J. Gen. Virol.* 2017;98(12):2912–3. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000959>
- Kinder J.T., Moncman C.L., Barrett C., et al. Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections in three-dimensional human airway tissues expose an interesting dichotomy in viral replication, spread, and inhibition by neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2020;94(20):e01068-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01068-20>
- 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)
- Cao D., Gao Y., Liang B. Structural insights into the respiratory syncytial virus RNA synthesis complexes. *Viruses*. 2021;13(5):834. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13050834>
- Jeffrey C.E., Rixon H.W., Brown G., et al. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology*. 2003;306(2):254–67. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00016-8)
- Rincheval V., Lelek M., Gault E., et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat. Commun.* 2017;8(1):563. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00655-9>
- Shahriari S., Gordon J., Ghildyal R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. *Virol. J.* 2016;13(1):161. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0618-z>
- McLellan J.S., Ray W.C., Peeples M.E. Structure and function of RSV surface glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013;372:83–104. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_4
- Scudero O.B., Santiago V.F., Palmisano G., et al. The respiratory syncytial virus M2-2 protein is targeted for proteasome degradation and inhibits translation and stress granules assembly. *PLoS One*. 2023;18(7):e0289100. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289100>
- Fontana J.M., Bankamp B., Rota P.A. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol. Rev.* 2008;225:46–67. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00669.x>
- Wu W., Tran K.C., Teng M.N., et al. The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology. *J. Virol.* 2012;86(15):7777–89. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00460-12>
- Jung H.E., Kim T.H., Lee H.K. Contribution of dendritic cells in protective immunity against respiratory syncytial virus infection. *Viruses*. 2020;12(1):102. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12010102>
- Chanock R., Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am. J. Hyg.* 1957;66(3):291–300. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119902>
- Connors M., Collins P.L., Firestone C.Y., Murphy B.R. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J. Virol.* 1991;65(3):1634–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.65.3.1634-1637.1991>
- Graham B.S. Immunological goals for respiratory syncytial virus vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* 2019;59:57–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.005>
- Swanson K.A., Settembre E.C., Shaw C.A., et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(23):9619–24. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106536108>
- Andreano E., Paciello I., Bardelli M., et al. The respiratory syncytial virus (RSV) prefusion F-protein functional antibody repertoire in adult healthy donors. *EMBO Mol. Med.* 2021;13(6):e14035. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.202114035>
- Salk J.E. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. *J. Am. Med. Assoc.* 1953;151(13):1081–98.
- Chin J., Magoffin R.L., Shearer L.A., et al. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am. J. Epidemiol.* 1969;89(4):449–63. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120957>
- Kim H.W., Canchola J.G., Brandt C.D., et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 1969;89(4):422–34. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120955>
- Vissers M., Ahout I.M., de Jonge M.L., Ferwerda G. Mucosal IgG levels correlate better with respiratory syncytial virus load and inflammation than plasma IgG levels. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015;23(3):243–5. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00590-15>
- Karron R.A., Buonagurio D.A., Georgiu A.F., et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(25):13961–6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13961>
- Лещинская Н.П. СЕА. Клиника и лечение гриппа и других ОРЗ. В кн.: *Сборник научных трудов ВНИИ гриппа МЗ СССР*. Ленинград;1982:172–7. Leshchinskaya N.P. СЕА. Clinic and treatment of influenza and other acute respiratory infections. In: *Collection of Scientific Papers of the All-Russian Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the USSR*. Leningrad;1982:172–7.
- Topalidou X., Kalergis A.M., Papazisis G. Respiratory syncytial virus vaccines: A review of the candidates and the approved vaccines. *Pathogens*. 2023;12(10):1259. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12101259>
- Mazur N.I., 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)
- Mazur N.I., Higgins D., Nunes M.C., et al. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and

- promising candidates. *Lancet Infect. Dis.* 2018;18(10):e295–311. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30292-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30292-5)
31. Kelleher K., Subramaniam N., Drysdale S.B. The recent landscape of RSV vaccine research. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* 2025;13:25151355241310601. DOI: <https://doi.org/10.1177/25151355241310601>
32. Zhang G., Zhao B., Liu J. The development of animal models for respiratory syncytial virus (RSV) infection and enhanced RSV disease. *Viruses.* 2024;16(11):1701. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16111701>
33. Drysdale S.B., Thwaites R.S., Price J., et al. What have we learned from animal studies of immune responses to respiratory syncytial virus infection? *J. Clin. Virol.* 2024;175:105731. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2024.105731>
34. Yuan M., Han Z., Liang Y., et al. mRNA nanodelivery systems: targeting strategies and administration routes. *Biomater. Res.* 2023;27(1):90. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00425-3>
35. Shaw C.A., Mithani R., Kapoor A., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an mRNA-based respiratory syncytial virus vaccine in healthy young adults in a phase 1 clinical trial. *J. Infect. Dis.* 2024;230(3):e637–46. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae035>
36. Corbett K.S., Edwards D.K., Leist S.R., et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature.* 2020;586(7830):567–71. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
37. Aliprantis A.O., Shaw C.A., Griffin P., et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based RSV prefusion F protein vaccine in healthy younger and older adults. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021;17(5):1248–61. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1829899>
38. Nussbaum J., Cao X., Railkar R.A., et al. Evaluation of a stabilized RSV pre-fusion F mRNA vaccine: Preclinical studies and Phase 1 clinical testing in healthy adults. *Vaccine.* 2023;41(44):6488–501. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.05.062>
39. Oomens A.G., Bevis K.P., Wertz G.W. The cytoplasmic tail of the human respiratory syncytial virus F protein plays critical roles in cellular localization of the F protein and infectious progeny production. *J. Virol.* 2006;80(21):10465–77. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01439-06>
40. Mauger D.M., Cabral B.J., Presnyak V., et al. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(48):24075–83. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1908052116>
41. Wilson E., Goswami J., Baqui A.H., et al. Efficacy and safety of an mRNA-based RSV PreF vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2023;389(24):2233–44. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2307079>
42. Исакова-Сивак И.Н., Кореньков Д.А., Федорова Е.А. и др. Поиск иммунодоминантных эпитопов респираторно-синцитиального вируса для конструирования векторных вакцин на основе вирусов гриппа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016;161(4):523–7. EDN: <https://elibrary.ru/vscven>
- Isakova-Sivak I.N., Korenkov D.A., Fedorova E.A., et al. Analysis of immune epitopes of respiratory syncytial virus for designing of vectored vaccines based on influenza virus platform. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2016;161(4):533–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3454-7> EDN: <https://elibrary.ru/yuxboh>
43. Matyushenko V., Kotomina T., Kudryavtsev I., et al. Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung-localized memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell responses. *Antiviral Res.* 2020;182:104864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104864>
44. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Stepanova E., et al. Neutralizing epitope of the fusion protein of respiratory syncytial virus embedded in the HA molecule of LAIV virus is not sufficient to prevent RS virus pulmonary replication but ameliorates lung pathology following RSV infection in mice. *Open Microbiol. J.* 2020;14(1):147–56. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874285802014010147>
45. Pulkina A., Vasilyev K., Muzhikyan A., et al. IgGκ signal peptide enhances the efficacy of an influenza vector vaccine against respiratory syncytial virus infection in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(14):11445. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241411445>
46. Samy N., Reichhardt D., Schmidt D., et al. Safety and immunogenicity of novel modified vaccinia Ankara-vectored RSV vaccine: A randomized phase I clinical trial. *Vaccine.* 2020;38(11):2608–19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.055>
47. Jordan E., Lawrence S.J., Meyer T.P.H., et al. Broad antibody and cellular immune response from a phase 2 clinical trial with a novel multivalent poxvirus-based respiratory syncytial virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 2021;223(6):1062–72. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa460>
48. Green C.A., Scarselli E., Voysey M., et al. Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ Open.* 2015;5(10):e008748. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008748>
49. Green C.A., Scarselli E., Sande C.J., et al. Chimpanzee adenovirus- and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(300):300ra126. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5745>
50. Pierantoni A., Esposito M.L., Ammendola V., et al. Mucosal delivery of a vectored RSV vaccine is safe and elicits protective immunity in rodents and nonhuman primates. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2015;2:15018. DOI: <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.18>
51. Shan J., Britton P.N., King C.L., Booy R. The immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus vaccines in development: A systematic review. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2021;15(4):539–51. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12850>
52. Green C.A., Sande C.J., Scarselli E., et al. Novel genetically-modified chimpanzee adenovirus and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine safely boosts humoral and cellular immunity in healthy older adults. *J. Infect.* 2019;78(5):382–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.02.003>
53. Rezaee F., Linfield D.T., Harford T.J., Piedimonte G. Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. *Curr. Opin. Virol.* 2017;24:70–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.015>
54. Widjoatmodjo M.N., Bogaert L., Meek B., et al. Recombinant low-seroprevalent adenoviral vectors Ad26 and Ad35 expressing the respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein induce protective immunity against RSV infection in cotton rats. *Vaccine.* 2015;33(41):5406–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.056>
55. Comeaux C.A., Bart S., Bastian A.R., et al. Safety, immunogenicity, and regimen selection of Ad26.RSV.preF-based vaccine combinations: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a study. *J. Infect. Dis.* 2024;229(1):19–29. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad220>
56. Sadoff J., De Paepe E., Haazen W., et al. Safety and immunogenicity of the Ad26.RSV.preF investigational vaccine coadmin-

- istered with an influenza vaccine in older adults. *J. Infect. Dis.* 2021;223(4):699–708.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa409>
57. Stuart A.S.V., Virta M., Williams K., et al. Phase 1/2a safety and immunogenicity of an adenovirus 26 vector respiratory syncytial virus (RSV) vaccine encoding prefusion F in adults 18–50 years and RSV-seropositive children 12–24 months. *J. Infect. Dis.* 2022;227(1):71–82.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac407>
 58. Cicconi P., Jones C., Sarkar E., et al. First-in-human randomized study to assess the safety and immunogenicity of an investigational respiratory syncytial virus (RSV) vaccine based on chimpanzee-adenovirus-155 viral vector-expressing RSV fusion, nucleocapsid, and antitermination viral proteins in healthy adults. *Clin. Infect. Dis.* 2020;70(10):2073–81.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz653>
 59. Lee L.Y., Ha do L.A., Simmons C., et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 2008;118(10):3478–90. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI32460>
 60. Díez-Domingo J., Sáez-Llorens X., Rodríguez-Weber M.A., et al. Safety and immunogenicity of a ChAd155-vectored respiratory syncytial virus (RSV) vaccine in healthy RSV-seropositive children 12–23 months of age. *J. Infect. Dis.* 2023;227(11):1293–302.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac481>
 61. Saez-Llorens X., Norero X., Mussi-Pinhata M.M., et al. Safety and immunogenicity of a ChAd155-vectored respiratory syncytial virus vaccine in infants 6–7 months of age: a phase 1/2 randomized trial. *J. Infect. Dis.* 2024;229(1):95–107.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad271>
 62. Haller A.A., Miller T., Mitiku M., Coelingh K. Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector. *J. Virol.* 2000;74(24):11626–35.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11626-11635.2000>
 63. Gomez M., Mufson M.A., Dubovsky F., et al. Phase-I study MEDI-534, of a live, attenuated intranasal vaccine against respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in seropositive children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009;28(7):655–8.
DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318199c3b1>
 64. Bernstein D.I., Malkin E., Abughali N., et al. Phase 1 study of the safety and immunogenicity of a live, attenuated respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 vaccine in seronegative children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012;31(2):109–14.
DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31823386f1>
 65. Scaggs Huang F., Bernstein D.I., Slobod K.S., et al. Safety and immunogenicity of an intranasal sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021;17(2):554–9.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
 66. Wright P.F., Karron R.A., Belshe R.B., et al. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(5):1331–42. DOI: <https://doi.org/10.1086/315859>
 67. Karron R.A., Wright P.F., Belshe R.B., et al. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J. Infect. Dis.* 2005;191(7):1093–104. DOI: <https://doi.org/10.1086/427813>
 68. Wright P.F., Karron R.A., Belshe R.B., et al. The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine.* 2007;25(42):7372–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.014>
 69. Soto J.A., Stephens L.M., Waldstein K.A., et al. Current insights in the development of efficacious vaccines against RSV. *Front. Immunol.* 2020;11:1507.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01507>
 70. Karron R.A., Buchholz U.J., Collins P.L. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013;372:259–84.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_13
 71. Schickli J.H., Kaur J., Tang R.S. Nonclinical phenotypic and genotypic analyses of a Phase 1 pediatric respiratory syncytial virus vaccine candidate MEDI-559 (rA2cp248/404/1030ΔSH) at permissive and non-permissive temperatures. *Virus Res.* 2012;169(1):38–47.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.027>
 72. Malkin E., Yogev R., Abughali N., et al. Safety and immunogenicity of a live attenuated RSV vaccine in healthy RSV-seronegative children 5 to 24 months of age. *PLoS One.* 2013;8(10):e77104.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077104>
 73. Buchholz U.J., Cunningham C.K., Muresan P., et al. Live respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidate containing stabilized temperature-sensitivity mutations is highly attenuated in RSV-seronegative infants and children. *J. Infect. Dis.* 2018;217(9):1338–46.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy066>
 74. Bermingham A., Collins P.L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(20):11259–64.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259>
 75. Karron R.A., Luongo C., Thumar B., et al. A gene deletion that up-regulates viral gene expression yields an attenuated RSV vaccine with improved antibody responses in children. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(312):312ra175.
DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8463>
 76. McFarland E.J., Karron R.A., Muresan P., et al. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate with deletion of RNA synthesis regulatory protein M2-2 is highly immunogenic in children. *J. Infect. Dis.* 2018;217(9):1347–55.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy040>
 77. Bukreyev A., Belyakov I.M., Berzofsky J.A., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells. *J. Virol.* 2001;75(24):12128–40.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12128-12140.2001>
 78. McFarland E.J., Karron R.A., Muresan P., et al. Live respiratory syncytial virus attenuated by M2-2 deletion and stabilized temperature sensitivity mutation 1030s is a promising vaccine candidate in children. *J. Infect. Dis.* 2020;221(4):534–43.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz603>
 79. Stobart C.C., Rostad C.A., Ke Z., et al. A live RSV vaccine with engineered thermostability is immunogenic in cotton rats despite high attenuation. *Nat. Commun.* 2016;7:13916.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13916>
 80. Mirzaei H., Faghiloo E. Viruses as key modulators of the TGF- β pathway; a double-edged sword involved in cancer. *Rev. Med. Virol.* 2018;28(2):e1967.
DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.1967>
 81. Bakre A., Wu W., Hiscox J., et al. Human respiratory syncytial virus non-structural protein NS1 modifies miR-24 expression via transforming growth factor- β . *J. Gen. Virol.* 2015;96(11):3179–91. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000261>
 82. Karron R.A., Luongo C., Mateo J.S., et al. Safety and immunogenicity of the respiratory syncytial virus vaccine RSV/ΔNS2/Δ1313/I1314L in RSV-seronegative children. *J. Infect. Dis.* 2020;222(1):82–91. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz408>
 83. Rossey I., Saelens X. Vaccines against human respiratory syncytial virus in clinical trials, where are we now? *Expert. Rev. Vaccines.* 2019;18(10):1053–67.
DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1675520>
 84. Brito L.A., O'Hagan D.T. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *J. Control Release.*

ОБЗОРЫ

- 2014;190:563–79.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.027>
85. Delgado M.F., Coviello S., Monsalvo A.C., et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat. Med.* 2009;15(1):34–41. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.1894>
86. Graham B.S. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):149–66.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00972.x>
87. Crank M.C., Ruckwardt T.J., Chen M., et al. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science.* 2019;365(6452):505–9.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aav9033>
88. Ruckwardt T.J., Morabito K.M., Phung E., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of the respiratory syncytial virus prefusion F subunit vaccine DS-Cav1: a phase 1, randomised, open-label, dose-escalation clinical trial. *Lancet Respir. Med.* 2021;9(10):1111–20.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00098-9)
89. Langley J.M., MacDonald L.D., Weir G.M., et al. A respiratory syncytial virus vaccine based on the small hydrophobic protein ectodomain presented with a novel lipid-based formulation is highly immunogenic and safe in adults: a first-in-humans study. *J. Infect. Dis.* 2018;218(3):378–87.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy177>
90. Kotb S., Haranaka M., Folschweiller N., et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus prefusion F protein (RSVPreF3) candidate vaccine in older Japanese adults: A phase I, randomized, observer-blind clinical trial. *Respir. Investig.* 2023;61(2):261–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2022.11.003>
91. Leroux-Roels I., Davis M.G., Steenackers K., et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus prefusion F (RSVPreF3) candidate vaccine in older adults: phase 1/2 randomized clinical trial. *J. Infect. Dis.* 2023;227(6):761–72.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac327>
92. Leroux-Roels I., Van Ranst M., Vandermeulen C., et al. Safety and immunogenicity of a revaccination with a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine in older adults: a phase 2b study. *J. Infect. Dis.* 2024;229(2):355–66.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad321>
93. Schwarz T.F., Hwang S.J., Ylisastigui P., et al. Immunogenicity and safety following 1 dose of AS01E-adjuvanted respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in older adults: a phase 3 trial. *J. Infect. Dis.* 2024;230(1):e102–10.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad546>
94. Ison M.G., Papi A., Athan E., et al. Efficacy and safety of respiratory syncytial virus (RSV) prefusion F protein vaccine (RSVPreF3 OA) in older adults over 2 RSV seasons. *Clin. Infect. Dis.* 2024;78(6):1732–44.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae010>
95. Walsh E.E., Falsey A.R., Scott D.A., et al. A Randomized phase 1/2 study of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine. *J. Infect. Dis.* 2022;225(8):1357–66.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab612>
96. Kampmann B., Madhi S.A., Munjal I., et al. Bivalent prefusion F vaccine in pregnancy to prevent RSV illness in infants. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(16):1451–64.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2216480>
97. Walsh E.E., Perez Marc G., Zareba A.M., et al. Efficacy and safety of a bivalent RSV prefusion F vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(16):1465–77.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213836>
98. Davis M., Towner W., DeHaan E., et al. Bivalent RSVpreF vaccine in adults 18 to <60 years old with high-risk conditions. *Clin. Infect. Dis.* 2024;ciae550.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae550>
99. Jeong H., Seong B.L. Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *J. Microbiol.* 2017;55(3):220–30.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7058-3>
100. Muñoz F.M., Swamy G.K., Hickman S.P., et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus fusion (F) protein nanoparticle vaccine in healthy third-trimester pregnant women and their infants. *J. Infect. Dis.* 2019;220(11):1802–15. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz390>
101. Madhi S.A., Polack F.P., Piedra P.A., et al. Respiratory syncytial virus vaccination during pregnancy and effects in infants. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(5):426–39.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908380>
102. Van Braeckel-Budimir N., Haijema B.J., Leenhouts K. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications. *Front. Immunol.* 2013;4:282.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00282>
103. Rigter A., Widjaja I., Versantvoort H., et al. A protective and safe intranasal RSV vaccine based on a recombinant prefusion-like form of the F protein bound to bacterium-like particles. *PLoS One.* 2013;8(8):e71072.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071072>
104. Ascough S., Vlachantoni I., Kalyan M., et al. Local and systemic immunity against respiratory syncytial virus induced by a novel intranasal vaccine. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019;200(4):481–92.
DOI: <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1921OC>
105. Leroux-Roels I., Bruhwylter J., Stergiou L., et al. Double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study evaluating the safety and immunogenicity of an epitope-specific chemically defined nanoparticle RSV vaccine. *Vaccines (Basel).* 2023;11(2):367. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020367>
106. Noble M., Khan R.A., Walker B., et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalisation in children aged <=5 years: a scoping review of literature from 2009 to 2021. *ERJ Open Res.* 2022;8(2):00593-2021.
DOI: <https://doi.org/10.1183/23120541.00593-2021>
107. Coultas J.A., Smyth R., Openshaw P.J. Respiratory syncytial virus (RSV): a scourge from infancy to old age. *Thorax.* 2019;74(10):986–93.
DOI: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212212>
108. Shahabi A., Peneva D., Incerti D., et al. Assessing variation in the cost of palivizumab for respiratory syncytial virus prevention in preterm infants. *Pharmacoecon. Open.* 2018;2(1):53–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41669-017-0042-3>
109. Keam S.J. Nirsevimab: first approval. *Drugs.* 2023;83(2):181–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01829-6>
110. Mueller S., Stauff C.B., Kalkeri R., et al. A codon-pair deoptimized live-attenuated vaccine against respiratory syncytial virus is immunogenic and efficacious in non-human primates. *Vaccine.* 2020;38(14):2943–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.02.056>
111. Widjoatmodjo M.N., Boes J., van Bers M., et al. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats. *Viol. J.* 2010;7:114.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-114>
112. Luongo C., Winter C.C., Collins P.L., Buchholz U.J. Increased genetic and phenotypic stability of a promising live-attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate by reverse genetics. *J. Virol.* 2012;86(19):10792–804.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01227-12>
113. Luongo C., Winter C.C., Collins P.L., Buchholz U.J. Respiratory syncytial virus modified by deletions of the NS2 gene and amino acid S1313 of the L polymerase protein is a temperature-sensitive, live-attenuated vaccine candidate that is

- phenotypically stable at physiological temperature. *J. Virol.* 2013;87(4):1985–96.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02769-12>
114. Endt K., Wollmann Y., Haug J., et al. A recombinant MVA-based RSV vaccine induces T-cell and antibody responses that cooperate in the protection against RSV infection. *Front. Immunol.* 2022;13:841471.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.841471>
 115. Taylor G., Thom M., Capone S., et al. Efficacy of a virus-vectored vaccine against human and bovine respiratory syncytial virus infections. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(300):300ra127.
DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5757>
 116. Saeland E., van der Fits L., Bolder R., et al. Immunogenicity and protective efficacy of adenoviral and subunit RSV vaccines based on stabilized prefusion F protein in pre-clinical models. *Vaccine.* 2022;40(6):934–44.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.12.043>
 117. Joyce C., Scallan C.D., Mateo R., et al. Orally administered adenoviral-based vaccine induces respiratory mucosal memory and protection against RSV infection in cotton rats. *Vaccine.* 2018;36(29):4265–77.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.112>
 118. de Jong R., Stockhofe-Zurwieden N., Bonsing J., et al. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves. *Nat. Commun.* 2022;13(1):6142.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33649-3>
 119. Jones B.G., Sealy R.E., Rudraraju R., et al. Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection. *Vaccine.* 2012;30(5):959–68.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.046>
 120. Cespedes P.F., Rey-Jurado E., Espinoza J.A., et al. A single, low dose of a cGMP recombinant BCG vaccine elicits protective T cell immunity against the human respiratory syncytial virus infection and prevents lung pathology in mice. *Vaccine.* 2017;35(5):757–66.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.048>
 121. Bueno S.M., Gonzalez P.A., Cautivo K.M., et al. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(52):20822–7.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0806244105>
 122. Cautivo K.M., Bueno S.M., Cortes C.M., et al. Efficient lung recruitment of respiratory syncytial virus-specific Th1 cells induced by recombinant bacillus Calmette-Guerin promotes virus clearance and protects from infection. *J. Immunol.* 2010;185(12):7633–45.
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903452>
 123. Diaz F.E., Guerra-Maupome M., McDonald P.O., et al. A recombinant BCG vaccine is safe and immunogenic in neonatal calves and reduces the clinical disease caused by the respiratory syncytial virus. *Front. Immunol.* 2021;12:664212.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664212>
 124. Olszewska W., Suezter Y., Sutter G., Openshaw P.J. Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins. *Vaccine.* 2004;23(2):215–21.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.015>
 125. Bembridge G.P., Garcia-Beato R., Lopez J.A., et al. Subcellular site of expression and route of vaccination influence pulmonary eosinophilia following respiratory syncytial virus challenge in BALB/c mice sensitized to the attachment G protein. *J. Immunol.* 1998;161(5):2473–80.
 126. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Matyushenko V., et al. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease. *Antiviral Res.* 2019;168:9–17.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.001>
 127. McLellan J.S., Chen M., Joyce M.G., et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science.* 2013;342(6158):592–8.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1243283>
 128. Zohar T., Hsiao J.C., Mehta N., et al. Upper and lower respiratory tract correlates of protection against respiratory syncytial virus following vaccination of nonhuman primates. *Cell Host Microbe.* 2022;30(1):41–52.e5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.006>
 129. Sastry M., Zhang B., Chen M., et al. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186854.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186854>
 130. MacDonald L.D., MacKay A., Kaliaperumal V., et al. Type III hypersensitivity reactions to a B cell epitope antigen are abrogated using a depot forming vaccine platform. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018;14(1):59–66.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1375637>
 131. Li C., Zhou X., Zhong Y., et al. A recombinant G protein plus cyclosporine A-based respiratory syncytial virus vaccine elicits humoral and regulatory T cell responses against infection without vaccine-enhanced disease. *J. Immunol.* 2016;196(4):1721–31.
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502103>
 132. Su C., Zhong Y., Zhao G., et al. RSV pre-fusion F protein enhances the G protein antibody and anti-infectious responses. *NPJ Vaccines.* 2022;7(1):168.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00591-w>
 133. Stokes A.H., Franklin K., Fisher D.E., et al. Repeated dose toxicity study and developmental and reproductive toxicology studies of a respiratory syncytial virus candidate vaccine in rabbits and rats. *Int. J. Toxicol.* 2021;40(2):125–42.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581820985782>
 134. Murphy B.R., Sotnikov A.V., Lawrence L.A., et al. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3–6 months after immunization. *Vaccine.* 1990;8(5):497–502.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(90\)90253-i](https://doi.org/10.1016/0264-410x(90)90253-i)
 135. Zuniga A., Rassek O., Vrohings M., et al. An epitope-specific chemically defined nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus. *NPJ Vaccines.* 2021;6(1):85.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00347-y>
 136. Marcandalli J., Fiala B., Ols S., et al. Induction of potent neutralizing antibody responses by a designed protein nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus. *Cell.* 2019;176(6):1420–31.e17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.046>
 137. Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б. и др. Локальный гумморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации. *Медицинская иммунология.* 2006;8(4):511–6. Petukhova G.D., Naikhin A.N., Barantseva I.B., et al. Local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination. *Medical Immunology (Russia).* 2006;8(4):511–6.
EDN: <https://elibrary.ru/hspqxz>
 138. Beran J., Lickliter J.D., Schwarz T.F., et al. Safety and immunogenicity of 3 formulations of an investigational respiratory syncytial virus vaccine in nonpregnant women: results from 2 phase 2 trials. *J. Infect. Dis.* 2018;217(10):1616–25.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy065>
 139. Jordan E., Kabir G., Schultz S., et al. Decreased viral load, symptom reduction, and prevention of respiratory syncytial virus infection with MVA-BN-RSV vaccine. 2022. *medRxiv*. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.12.02.22283030>
 140. Jordan E., Kabir G., Schultz S., et al. Reduced respiratory syncytial virus load, symptoms, and infections: a human challenge trial of MVA-BN-RSV vaccine. *J. Infect. Dis.* 2023;228(8):999–1011.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad108>

ОБЗОРЫ

141. Williams K., Bastian A.R., Feldman R.A., et al. Phase 1 safety and immunogenicity study of a respiratory syncytial virus vaccine with an adenovirus 26 vector encoding prefusion F (Ad26.RSV.pref) in adults aged ≥ 60 years. *J. Infect. Dis.* 2020;222(6):979–88. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa193>
142. Sadoff J., De Paep E., DeVincenzo J., et al. Prevention of respiratory syncytial virus infection in healthy adults by a single immunization of Ad26.RSV.pref in a human challenge study. *J. Infect. Dis.* 2022;226(3):396–406. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab003>
143. Abarca K., Rey-Jurado E., Munoz-Durango N., et al. Safety and immunogenicity evaluation of recombinant BCG vaccine against respiratory syncytial virus in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I clinical trial. *EClinicalMedicine.* 2020;27:100517. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100517>
144. Cunningham C.K., Karron R., Muresan P., et al. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccine with deletion of RNA synthesis regulatory protein M2-2 and cold passage mutations is overattenuated. *Open Forum Infect. Dis.* 2019;6(6):ofz212. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz212>
145. McFarland E.J., Karron R.A., Muresan P., et al. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccine with M2-2 deletion and with small hydrophobic noncoding region is highly immunogenic in children. *J. Infect. Dis.* 2020;221(12):2050–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa049>
146. Cunningham C.K., Karron R.A., Muresan P., et al. Evaluation of recombinant live-attenuated respiratory syncytial virus (RSV) vaccines RSV/DeltaNS2/Delta1313/I1314L and RSV/276 in RSV-seronegative children. *J. Infect. Dis.* 2022;226(12):2069–78. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac253>
147. Schwarz T.F., Johnson C., Grigat C., et al. Three dose levels of a maternal respiratory syncytial virus vaccine candidate are well tolerated and immunogenic in a randomized trial in non-pregnant women. *J. Infect. Dis.* 2022;225(12):2067–76. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab317>
148. Bebia Z., Reyes O., Jeanfreau R., et al. Safety and immunogenicity of an investigational respiratory syncytial virus vaccine (RSVPreF3) in mothers and their infants: a phase 2 randomized trial. *J. Infect. Dis.* 2023;228(3):299–310. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad024>
149. Papi A., Ison M.G., Langley J.M., et al. Respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(7):595–608. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2209604>
150. Chandler R., Montenegro N., Llorach C., et al. Immunogenicity, reactogenicity, and safety of AS01E-adjuvanted RSV prefusion F protein-based candidate vaccine (RSVPreF3 OA) when co-administered with a seasonal quadrivalent influenza vaccine in older adults: results of a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 2024;ciad786. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad786>
151. Ferguson M., Murray A., Pliamm L., et al. Lot-to-lot immunogenicity consistency of the respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in older adults. *Vaccine X.* 2024;18:100494. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jvax.2024.100494>
152. Buynak R., Cannon K., DeAtkine D., et al. Randomized, open-label phase 3 study evaluating immunogenicity, safety, and reactogenicity of RSVPreF3 OA coadministered with FLU-QIV-HD in adults aged ≥ 65 . *Infect. Dis. Ther.* 2024;13(8):1789–805. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40121-024-00985-4>
153. Clark R., Davies S., Labrador J., et al. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine when co-administered with adjuvanted seasonal quadrivalent influenza vaccine in older adults: a phase 3 randomized trial. *Clin. Infect. Dis.* 2024;79(4):1088–98. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae365>
154. Ferguson M., Schwarz T.F., Nunez S.A., et al. Noninferior immunogenicity and consistent safety of respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in adults 50–59 years compared to ≥ 60 years of age. *Clin. Infect. Dis.* 2024;79(4):1074–84. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae364>
155. Leroux-Roels G., De Boever F., Maes C., et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein F subunit vaccine in healthy adults: Results of a phase I, randomized, observer-blind, controlled, dosage-escalation study. *Vaccine.* 2019;37(20):2694–703. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.011>
156. Peterson J.T., Zareba A.M., Fitz-Patrick D., et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine when coadministered with a tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccine. *J. Infect. Dis.* 2022;225(12):2077–86. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab505>
157. Falsey A.R., Walsh E.E., Scott D.A., et al. Phase 1/2 randomized study of the immunogenicity, safety, and tolerability of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine in adults with concomitant inactivated influenza vaccine. *J. Infect. Dis.* 2022;225(12):2056–66. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab611>
158. Simões E.A.F., Center K.J., Tita A.T.N., et al. Prefusion F protein-based respiratory syncytial virus immunization in pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(17):1615–26. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2106062>
159. Baber J., Arya M., Moodley Y., et al. A phase 1/2 study of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine with and without adjuvant in healthy older adults. *J. Infect. Dis.* 2022;226(12):2054–63. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac189>
160. Ginsburg A.S., Srikantiah P. Respiratory syncytial virus: promising progress against a leading cause of pneumonia. *Lancet Glob. Health.* 2021;9(12):e1644–5. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00455-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00455-1)
161. Schmoele-Thoma B., Zareba A.M., Jiang Q., et al. Vaccine efficacy in adults in a respiratory syncytial virus challenge study. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(25):2377–86. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116154>
162. Baker J., Aliabadi N., Munjal I., et al. Equivalent immunogenicity across three RSVpreF vaccine lots in healthy adults 18–49 years of age: Results of a randomized phase 3 study. *Vaccine.* 2024;42(13):3172–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.03.070>
163. Athan E., Baber J., Quan K., et al. Safety and immunogenicity of bivalent RSVpreF vaccine coadministered with seasonal inactivated influenza vaccine in older adults. *Clin. Infect. Dis.* 2024;78(5):1360–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad707>
164. Cheng X., Zhao G., Dong A., et al. A First-in-Human Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a G Protein-Based Recombinant Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Healthy Adults 18–45 Years of Age. *Vaccines (Basel).* 2023;11(5):999. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11050999>
165. Glenn G.M., Smith G., Fries L., et al. Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine. *Vaccine.* 2013;31(3):524–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.009>
166. Glenn G.M., Fries L.F., Thomas D.N., et al. A randomized, blinded, controlled, dose-ranging study of a respiratory syncytial virus recombinant fusion (F) nanoparticle vaccine in healthy women of childbearing age. *J. Infect. Dis.* 2016;213(3):411–22. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv406>
167. August A., Glenn G.M., Kpamegan E., et al. A phase 2 randomized, observer-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of aluminum-adjuvanted respiratory syncytial virus F

particle vaccine formulations in healthy women of childbearing age. *Vaccine*. 2017;35(30):3749–59.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.045>

168. Fries L., Shinde V., Stoddard J.J., et al. Immunogenicity and safety of a respiratory syncytial virus fusion protein (RSV

F) nanoparticle vaccine in older adults. *Immun. Ageing*. 2017;14:8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0090-7>

169. Goswami J., Baqui A.H., Doreski P.A., et al. Humoral immunogenicity of mRNA-1345 RSV vaccine in older adults. *J. Infect. Dis.* 2024;230(5):e996–1006.

DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae316>

Информация об авторе

Котомина Татьяна Сергеевна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, kotomina@iemspb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

Участие автора. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внёс существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочёл и одобрил финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.02.2025;
принята к публикации 18.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the author

Tatiana S. Kotomina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunology and prevention of viral infections, Smorodintsev virology department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, kotomina@iemspb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

Author's contribution. The author confirms that she meets 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 12.02.2025;
accepted for publication 18.04.2025;
published 28.04.2025