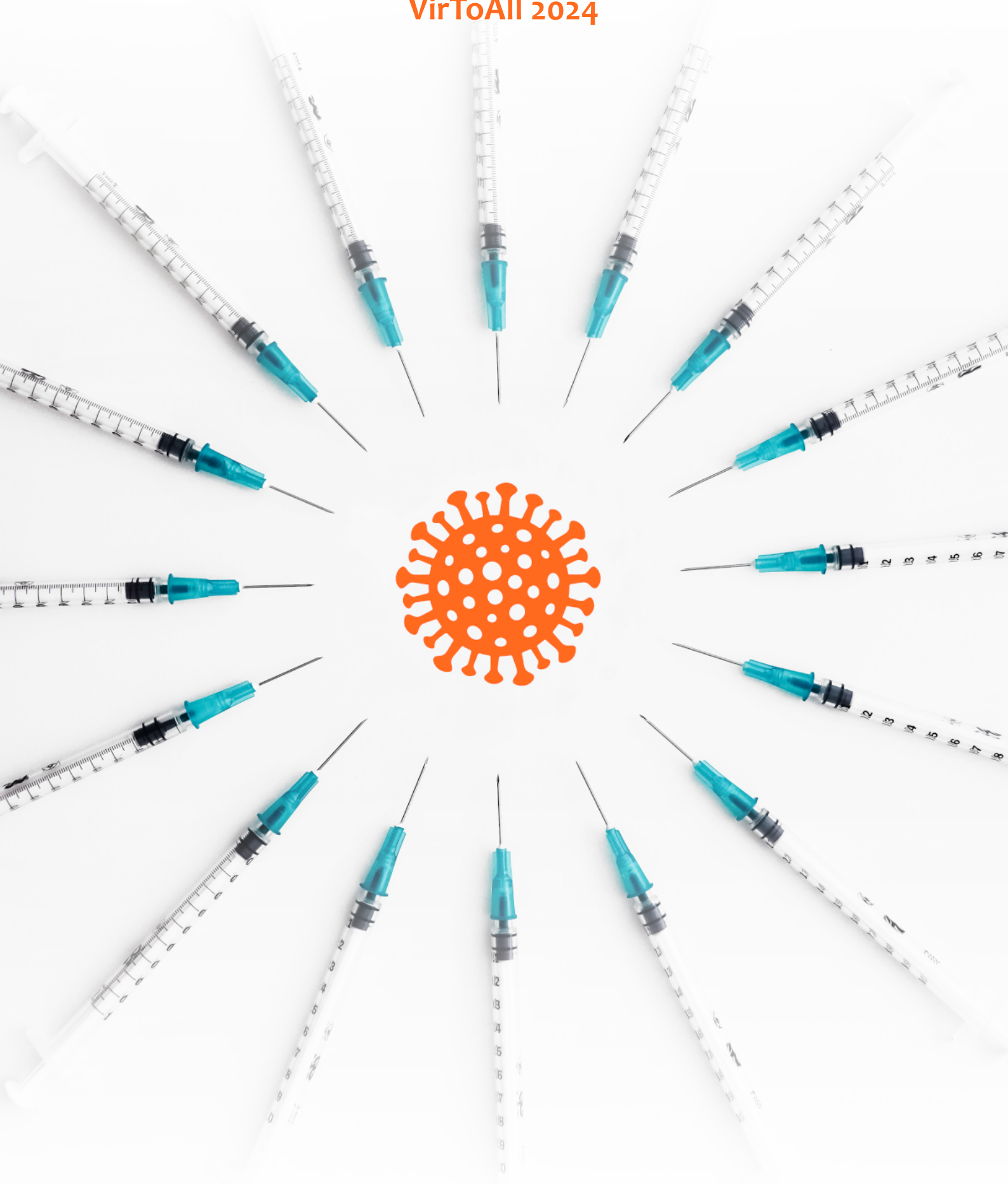


# ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ — ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ VirToAll 2024



**СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА  
ИМЕНИ А. А. СМОРОДИНЦЕВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---



# ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ

Сборник тезисов  
Всероссийской конференции молодых ученых

Санкт-Петербург

11–12 апреля 2024 года



Санкт-Петербург  
2024

УДК 578.7  
ББК 28.3:52.63  
В52

**Вирусные инфекции – от диагностики к клинике** : сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 11–12 апреля 2024 г. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2024. – 66 с.

Мероприятие проводится при поддержке Минобрнауки России в рамках реализации программы Научного центра мирового уровня по направлению «Передовые цифровые технологии», ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Материалы публикуются в авторской редакции.

Оригинал-макет подготовлен  
в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России

**ISBN 978-5-7422-8539-7**

- © Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2024
- © Jeremy Bezanger, Unsplash, фото обложки, 2024
- © Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Адаменко Л.С., Юрченко К.С., Шестопалов А.М.</i> РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА И ОЦЕНКА ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ	7
<i>Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Колтунова Ю.Б., Дашкевич А.М., Запольская В.В.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГЕПАТИТА А, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ	8
<i>Аринович А.С., Амвросьева Т.В., Кишкурно Е.П.</i> ПОЛИОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ-РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ	9
<i>Блохинова М.А., Канаева О.И.</i> АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	11
<i>Булычева Ю.И., Бутенко А.М., Маркина Т.А., Альховский С.В.</i> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХАНТАВИРУСОВ И ПАРАМИКСОВИРУСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БУРОЗУБОК В РЯЗАНСКОЙ ОБЛАСТИ	12
<i>Ведяйкин А.Д., Алексеев А.А., Арсениев А.Н., Воробьёва В.Д., Бирало Н.В., Кунгурова Л.А., Мельников А.С., Сердобинцев П.Ю., Курдюмова И.В., Криворучко А.Б., Ходорковский М.А., Морозова Н.Е.</i> РЕАКЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ РПА, КАК ВАЖНЫЙ КОМПОНЕНТ БЫСТРОЙ И ТОЧНОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ	13
<i>Вон П.Ф., Баженова Е.А., Степанова Е. А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> РАЗРАБОТКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ТИПА В С РАСШИРЕННЫМ СПЕКТРОМ ЗАЩИТЫ	15
<i>Дорош А.В., Смородинцева Е.А., Столяров К.А.</i> ЭТИОЛОГИЯ ТОРИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 ПО ДАННЫМ СИГНАЛЬНОГО НАДЗОРА	16
<i>Евдокимов А.А., Балдина А.А., Скорб Е.В.</i> ПОСЛОЙНАЯ МОДИФИКАЦИЯ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОДНОРАЗОВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ К ПАТОГЕНАМ	17
<i>Желтухина А.И., Бояринцева А.Ю., Мусаева Т.Д., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЛЕЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСОВ ГРИППА В ВИКТОРИАНСКОЙ ЛИНИИ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 (2020-2023 ГГ.)	18

<p><i>Иголкина А.А., Кусакин А.В., Маркин И.В., Голева О.В., Чухловин А.Б., Базиян Е.В., Эйсмонт Ю.А., Рогозина Н.В., Васильев В.В., Глотов О.С.</i>  ГЕНОТИПЫ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА, ВЫЯВЛЕННОГО У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА</p>	20
<p><i>Камрансарканди М., Шурыгина А.-П.С., Шуклина М.А., Романовская-Романько Е.А., Пулькина А.А., Ожерельева О.О., Сергеева М.В., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Варюшина Е.А.</i>  ИММУНОГЕННОСТЬ И КРОСС-ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН В РЕЖИМЕ ПРАЙМ-БУСТ ИММУНИЗАЦИИ <i>IN VIVO</i></p>	21
<p><i>Карташова А.А., Мухаметдинова Д.В., Марченко В.А., Жилинская И.Н.</i>  ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А(Н1N1)PDM09</p>	22
<p><i>Клабуков А.М., Галочкина А.В., Разгуляева Д.Н., Цыпышев Д.О., Волчо К.П., Штро А.А.</i>  ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ КОНЪЮГАТОВ 7-ГИДРОКСИКУМАРИНА И ТЕРПЕНОИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В ОТНОШЕНИИ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА</p>	24
<p><i>Коклюшкина А.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Амосова И.В.</i>  ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА ФИБРИЛЛЫ АД5КНОВ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВЕКТОРУ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА 5 ТИПА</p>	25
<p><i>Кондратьева В.М., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Гребенникова Т.В.</i>  ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ И СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА МЫШАХ И КРЫСАХ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19</p>	26
<p><i>Коробова З.Р.</i>  ВИРУСНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ COVID-19</p>	27
<p><i>Ксенафонтов А.Д., Фадеев А.В., Гешко С.А., Коржанова М., Комиссаров А.Б., Киселёва И.В., Лиознов Д.А.</i>  РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РИНОВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ SMART</p>	29
<p><i>Кудря К.С., Сергеева М.В.</i>  ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОЦЕНКИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПОДАВЛЕНИЯ БЛЯШКООБРАЗОВАНИЯ</p>	30
<p><i>Ладыгина М.Д., Романовская-Романько Е.А., Шуклина М.А., Пулькина А.А., Шамакова Д.А., Варюшина Е.А.</i>  ФОРМИРОВАНИЕ АНТИТЕЛЬНОГО И В-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА ПРИ МНОГОКРАТНЫХ ИММУНИЗАЦИЯХ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ У МЫШЕЙ</p>	32

<i>Мансур У., Фадеев А.В., Коржанова М., Передерий А.А., Ермилова Е.В., Комиссаров А.Б., Лиознов Д.А.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА ЧЕЛОВЕКА 1-ГО ТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ, ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ	34
<i>Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.</i> АДАПТАЦИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА ДЛЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА А/Н1N1 К КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МДСК И ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИОННЫХ МУТАЦИЙ В ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНАХ ВИРУСА НА ЕГО БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	36
<i>Никитин В.Н., Меркульева Ю.А., Сергеев А.А., Щербаков Д.Н.</i> ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХИМЕРНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА M12B9CN К БЕЛКУ M1 ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ	37
<i>Новицкая В.В., Меркурьев А.В., Меженская Д.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРОТОТИПА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ СО ВСТРОЕННОЙ В АНТИГЕННЫЙ САЙТ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ M2	39
<i>Олейник В.А., Ёлишин Н.Д., Плотникова М.А.</i> РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПЦР ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5 МЫШИ	40
<i>Передерий А.А., Айвазьян И.С., Коноплева С.А., Комиссаров А.Б.</i> ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗАННЫХ С SARS-COV-2 КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУТЕЙ У ЛЮДЕЙ С ДЕМЕНЦИЕЙ	42
<i>Петрова Е.Р.</i> РОЛЬ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В РАЗВИТИИ ТЯЖЕЛЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ. ВЛИЯНИЕ ПАНДЕМИИ SARS-CoV-2	44
<i>Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Васильева А.Д., Шелепанова Т.Н., Большакова М.В., Коновалова Н.И.</i> АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2023-2024 ГГ.	45
<i>Платова С.Е., Форгани М.</i> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ TBEV ANALYZER®	47
<i>Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Рак А.Я., Матюшенко В.А., Новицкая В.В., Костромитина А.Д., Чистякова А.К., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> УСИЛЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПУТЕМ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА	50

<p><i>Рак А.Я., Забродская Я.А., Прокопенко П.И., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i>  ВЛИЯНИЕ МЕДЛЕННЫХ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ГРИППА НА ЕГО АНТИГЕННОСТЬ И КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ</p>	51
<p><i>Рог И.С., Чудинов И.К., Корнеенко Е.В., Лукина-Гронская А.В., Матюшкина Д.С., Белелятдинова И.Х., Сперанская А.С.</i>  ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНЫХ КОИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ <i>M. PNEUMONIAE</i> В РОССИИ В ПЕРИОД ОКТЯБРЬ 2023 – ФЕВРАЛЬ 2024</p>	53
<p><i>Романовская-Романько Е.А., Пулькина А.А., Сагитдинова К.А.</i>  ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА РСВ</p>	54
<p><i>Рябинин Г.В.</i>  ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИОЦИНОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА <i>LACTOBACILLUS</i></p>	57
<p><i>Сактаганов Н.Т., Баймухаметова А.М., Байсейит С.Б., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Кливлеева Н.Г.</i>  ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ СОБАК Г. АЛМАТЫ В 2023-2024 ГГ.</p>	58
<p><i>Сароян Т.А., Нохова А.Р., Басова П.С., Гутова Т.А., Шестопалов А.М., Шаршов К.А., Курская О.Г.</i>  ВКЛАД ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА <i>PNEUMOVIRIDAE</i> В СТРУКТУРУ ОРВИ У ДЕТЕЙ В Г. НОВОСИБИРСКЕ В 2020 – 2024 ГГ.</p>	59
<p><i>Табаров А.Т., Андреева О.В.</i>  ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА А ПРИ ПОМОЩИ ПОВЕРХНОСТНО-УСИЛЕННОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В СОВОКУПНОСТИ С АЛГОРИТМАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ</p>	60
<p><i>Тарлавин Н.В.</i>  ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ</p>	62
<p><i>Шамакова Д.А., Кудря К.С., Загрядский Н.С., Романовская-Романько Е.А., Сергеева М.В., Стукова М.А.</i>  БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ У МЫШЕЙ ВИРУСА ГРИППА В СДЕЛЕЦИИ В С-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ БЕЛКА <i>NS1</i></p>	63
<p><i>Широбокова С.А., Шабалина А.В., Сухих И. С., Долгова А.С., Дедков В.Г.</i>  РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ЧАПАРЕ</p>	64

# РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА И ОЦЕНКА ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ

*Адаменко Л.С.<sup>1,2</sup>, Юрченко К.С.<sup>1,2</sup>, Шестопалов А.М.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup>*НИИ вирусологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия*

Онколитические вирусы (ОВ) представляют большой класс природных и генетически модифицированных агентов, которые способствуют регрессии опухоли путем репликации в опухолевых клетках, индукции иммуногенной гибели клеток и стимуляции противоопухолевого иммунитета.

Штамм вируса болезни Ньюкасла (ВБН) NDV/Altai/pigeon/777/2010, выделенный нами из природного резервуара, демонстрирует онколитические свойства по результатам клеточных исследований на широкой панели перевиваемых опухолевых линий человека.

При разработке препаратов на основе вирусов важным элементом является продуктивность на культуре клеток. В рамках наших исследований мы провели работу по оптимизации наработки вирусной суспензии в зависимости от множественности заражения и времени и культивирования. Нарботка вируса осуществлялась на клеточной культуре Vero E6, в процессе которой были установлены что оптимальной множественностью заражения является соотношение 1:400 (вирус:клетка) и наибольшее количество инфекционных вирусных частиц нарабатывалось к 5 дню культивирования.

Лекарственная форма препарата не должна содержать посторонних примесей. К тому же необходимо обеспечить стабилизирующую среду для вируса, чтобы на протяжении всего срока хранения препарата живой вирус не потерял своей активности. По результатам исследования был определен оптимальный стабилизатор - 3% ГЭК его график хранения: 45 суток при температуре +4°C, 171 день при температуре -20°C и -70°C. Было получено три серии экспериментального препарата и изучена его эффективность на животных моделях.

Исследования на животных с различными привитыми опухолями (сингенные опухоли: Кребс-2, меланома В16, карцинома Льюиса, и ксенографты: НМРК человека и глиома С6) продемонстрировали лечебный противоопухолевый эффект при интратуморальной и внутривенной терапии разработанным препаратом, сравнимый с референс препаратом - «Циклофосфамид» - (противоопухолевый препарат «Эндоксан»), без каких либо сопутствующих отрицательных эффектов.

Исследования при внутривенной терапии сингенной аденокарциномы толстой кишки СТ26 и эктопическисубкутанно трансплантированной и органотопическиинтракраниальной глиомы С6 вирус-содержащим препаратом оказались эффективной, а степень терапевтического воздействия терапии была сопоставимой по всем основным показателям с группами животных, получавших стандартное лечение циклофосфамидом.

Таким образом, нами был получен экспериментальный лабораторный образец лекарственного противоопухолевого препарата на основе природного штамма вируса болезни Ньюкасла. Были оптимизированы условия культивирования вируса, выбран



технологичный метод очистки вирусной суспензии и подобран оптимальный стабилизатор, разрешенный к применению в медицине. Разработанный препарат обладает высокой противоопухолевой эффективностью как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* на экспериментальных опухолевых моделях.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №122110700001-5.

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГЕПАТИТА А, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

*Амвросьева Т.В.<sup>1</sup>, Поклонская Н.В.<sup>1</sup>, Ю.Б. Колтунова<sup>1</sup>,  
Дашкевич А.М.<sup>2</sup>, Запольская В.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Республика Беларусь*

Период наблюдения за вирусным гепатитом (ВГА) в Республике Беларусь условно можно разделить на 2 этапа: с 1982 г. по 2003 г. – довакцинальный и с 2003 г. – поствакцинальный. В довакцинальный период годовая заболеваемость составляла  $44,47 \pm 0,58$  случаев на 100 тыс. населения. Поэтапное введение иммунизации контингентов высокого риска инфицирования оказало влияние на развитие эпидемического процесса: заболеваемость снизилась в 44,9 раза, и в настоящее время колеблется в пределах  $2,03 - 0,24$  случаев на 100 тыс. населения (в среднем  $0,99 \pm 0,11$ ).

Согласно ретроспективному эпидемиологическому анализу, в последние 5 лет чаще заражение происходило через контаминированные продукты питания (24,3%) и контактно-бытовым путем (21,5%), реже инфекция реализовывалась водным путем (6,1%). В основном заболеваемость в Республике Беларусь носила спорадический характер. В отдельных регионах отмечались эпизоды групповой заболеваемости.

За период 2019-2023 гг. более 19% случаев ВГА классифицированы как «завозные», в том числе из стран Африки (5,7%), Ближнего Востока и Азии (5,7%), Европы (4,0%), Российской Федерации (3,6%).

По результатам проведенной генодиагностики, во время групповой заболеваемости, зарегистрированной в июле 2023 г., РНК вируса гепатита А (ГА) была выявлена в биологическом материале (сыворотке крови/фекалиях) всех заболевших пациентов. Дальнейшее генотипирование возбудителя по участку гена VP1-2A позволило отнести его к субгенотипу IA. Степень генетического родства вирусов ГА, обнаруженных у вовлеченных в данный эпизод пациентов, составила 100%. Это указывало на единый фактор передачи, которым, по результатам эпидемиологического расследования, могла быть контаминированная пища. Выполненный сравнительный биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей «белорусских» вирусов ГА с таковыми из базы данных GenBank показал достаточно высокое их сходство (99,8%) с вирусами ГА, циркулирующими

в России и ставшими причиной вспышки заболеваемости в г. Челябинск в 2023 г. Следует отметить, что субгенотип IA на протяжении 2018-2023 гг. регулярно регистрировался и был доминирующим на территории Беларуси, выступая в качестве возбудителя спорадической заболеваемости. В этот период циркулировали также субгенотипы IIIA и IB.

С начала 2024 г. в Республике Беларусь произошла смена генотипического пейзажа. Доминирующим в нем стал новый геновариант субгенотипа IB, с появлением которого начался рост заболеваемости ВГА во всех регионах страны. Результаты проведенного молекулярно-эпидемиологического анализа свидетельствуют о том, что все вирусы, обнаруженные у пациентов из разных областей республики, достоверно формировали единый кластер, что указывает на наличие эпидемической связи между отдельными случаями заболевания. На основании филогенетической реконструкции установлено, что вирусы того же субгенотипа IB, идентифицированные в других странах, в том числе в России (Рязань, 2022 г.), не формировали общие кластеры с «белорусскими» вирусами и, следовательно, вызванные ими случаи заболевания не были эпидемически связанными.

Полученные результаты позволяют предположить высокую вероятность заноса на территорию Беларуси возбудителя наблюдаемой в 2024 г. заболеваемости, что может быть связано с употреблением продукции, импортированной из стран ближневосточного/африканского регионов, где он распространен. Важно заметить, что идентифицированный у пациентов субгенотип IB в начале 2024 г. был выявлен в сточных водах, что по времени предшествовало росту заболеваемости.

Представленные данные указывают на необходимость регулярного осуществления молекулярно-эпидемиологического мониторинга за ВГА, который в постковидный период, исходя из наблюдаемой активизации инфекции практически во всех странах, приобретает все большую актуальность. Такие мониторинговые исследования не только на уровне популяции человека, но и сточных вод, будут способствовать оперативному выявлению новых геновариантов возбудителя с высоким эпидемическим потенциалом, что позволит прогнозировать возможные сценарии развития эпидпроцесса и принять соответствующие профилактические меры.

## **ПОЛИОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ-РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ**

*Аринович А.С.<sup>1</sup>, Амвросьева Т.В.<sup>1</sup>, Кишкурно Е.П.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», Боровляны, Республика Беларусь

Полиомавирусами ВКV и JCV инфицировано от 70 до 90% взрослого населения. Иммунная система не элиминирует их из организма после первичного заражения в детском возрасте, и инфекция переходит в латентную форму с персистенцией возбудителей в клетках мочевыделительной системы, мозга, селезенки и В-лимфоцитах. Наблюдаемая у 0,5-10%

здоровых серопозитивных лиц реактивация ВКВ, JCV не представляет клинической угрозы. Однако у иммунокомпрометированных лиц, к числу которых относятся реципиенты солидных органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), пациенты, получающие иммуносупрессивную и стероидную терапию вследствие аутоиммунных или онкологических заболеваний, ВИЧ+ пациенты, могут стать причиной тяжелых патологий. Как показывает мировой опыт, обнаружение возбудителей ПВИ с регистрацией значений вирусной нагрузки выше пороговых в сыворотке крови ( $>10^4$  ГЭ/мл) или в моче ( $>10^7$  ГЭ/мл) является чувствительным и специфичным предиктором развития полиомавирус-ассоциированной нефропатии (ПВАН) и геморрагического цистита (ГЦ), позволяющим выбрать адекватную лечебную тактику и избежать тяжелых вирусных осложнений.

По результатам проведенного нами исследования возбудители ПВИ обнаруживались у 49.5% детей-реципиентов почки (n=97) и у 70.83% детей-реципиентов ГСК(n=144).

У детей-реципиентов почки в раннем посттрансплантационном периоде (до 3-х месяцев) ВКВ в моче обнаруживался у 22.9%, JCV – у 20% (n=35). В позднем посттрансплантационном периоде (3-12 месяцев и более) преобладала JCV-инфекция (36.9%, n=87). Анализ динамики выявления ПВ показал регистрацию максимального количества случаев в период с первой недели до 1 месяца после операции с дальнейшим снижением частоты выявления новых эпизодов. В целом частота регистрации ВКВ инфекции имела тенденцию к росту с достижением максимальных показателей (62.5%) к 3 месяцу после трансплантации. В более поздний период (до 1 года и более) имело место ее снижение (до 10.4%). Первый пик активации JCV инфекции приходился на 2-ю неделю после трансплантации, затем следовало снижение к 3-му месяцу, и далее – рост частоты выявления возбудителя спустя 1 год (39.0%). У 8.2% детей-реципиентов почки была диагностирована дисфункция трансплантата в сочетании с выявленной ПВ-вирурией.

Среди детей-реципиентов ГСК ВКВ в моче обнаруживался у 61.8%, JCV – у 1.4%, ВКВ в сочетании с JCV – у 7.6%. Виремия в этой группе пациентов чаще была вызвана ВКВ (20.1%), хотя зарегистрировано и несколько случаев смешанной инфекции – 2.1%. Уровни вирусной нагрузки при виремии колебались в значениях от 99 ГЭ/мл до  $1,2 \times 10^9$  ГЭ/мл, а при вирурии – от 44 ГЭ/мл до  $7 \times 10^{12}$  ГЭ/мл. Результаты генодиагностики в динамике посттрансплантационного периода показали, что ПВИ в этой группе реципиентов активировалась ещё в период кондиционирования с достижением пика частоты обнаружения возбудителя на 15-28 день после трансплантации ГСК, затем следовало её плавное снижение.

Установлено, что ПВ-ассоциированная патология мочевыводящей системы у детей-реципиентов ГСК в виде геморрагического цистита встречалась в 4.86% случаев. У 2.7% он протекал в среднетяжелой форме, а у одного пациента – в тяжелой с развитием ВКВ-ассоциированного геморрагического нефрита, что внесло определенный вклад в смерть пациента. У 1 ребенка имела место угроза развития тампонады мочевого пузыря.

Представленные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о достаточно высокой частоте реактивации ПВ у реципиентов почки и ГСК, индуцирующих в отдельных случаях активный инфекционный процесс в посттрансплантационном периоде. Полученные данные указывают на необходимость обязательного вирусологического тестирования данной группы иммунокомпрометированных пациентов, основанном на количественном мониторинге вирусной нагрузки с первых дней после начала иммуносупрессивной терапии для предотвращения развития тяжелых вирусных осложнений и потери трансплантата.

## **АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

*Блохинова М.А., Канаева О.И.*

*ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия*

Актуальность: энтеровирусная инфекция (ЭВИ) - инфекционное заболевание, которое вызывается вирусами рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*. Диагноз «энтеровирусная инфекция» устанавливается на основании лабораторного подтверждения. Одной из наиболее актуальных задач, стоящей перед современной медициной, является обнаружение и идентификация возбудителей инфекционных заболеваний. Лабораторная диагностика ЭВИ включает в себя целый комплекс исследований и имеет ряд особенностей, которые связаны с многообразием возбудителей данной группы.

Цель: изучить современные методы диагностики ЭВИ и проанализировать результаты молекулярно-биологических и серологических методов идентификации энтеровирусов (ЭВ).

Материалы и методы: работа проводилась в лаборатории регионального центра по эпидемиологическому надзору за полиомиелитом, расположенного на базе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Для проведения исследования из коллекции было отобрано 60 штаммов, изолированных от больных ЭВИ, от здоровых детей до пяти лет, прибывших из неблагополучных по полиомиелиту территорий, а также из проб сточной воды. Путем секвенирования участка генома VP1 по Сэнгеру определяли тип энтеровируса. Для сравнения использовали реакцию нейтрализации с диагностическими моновалентными сыворотками производства ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН". В ходе реакции разведенные в 10-2 и 10-3 суспензии энтеровирусов в равных объемах смешивали с диагностическими сыворотками в микропланшете. После инкубации в течение 1 часа при 37°C вносили культуры клеток RD. После этого ежедневно отслеживали наличие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) в течение 3 дней.

Результаты и обсуждение: для лабораторной диагностики энтеровирусной инфекции применяют вирусологический, молекулярно-биологический и серологический методы. Вирусологический метод представляет собой выделение и идентификацию энтеровирусов на культурах клеток. Молекулярно-биологический включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование генома. В качестве серологической диагностики используются сыворотки со специфическими антителами, полученными от лабораторных животных. В основе метода лежит принцип взаимодействия известного вируса с гомологичными антителами, присутствующими в сыворотке, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток.

В ходе исследования идентифицированы 60 штаммов ЭВ различных серотипов на основе теста на нейтрализации антител. Выявленные ЭВ принадлежали видам А, В и С. Среди них обнаружены ЕСНО-3, 6, 11, 13, 20, 25, 29, 30, Сох-А2, А4, А7 А10, А13, ЭВ-71. Аналогичные результаты получены посредством секвенирования участка генома VP1 по Сэнгеру и сравнения полученной нуклеотидной последовательности с другими последовательностями, содержащимися в базе данных GenBank. Установлена корреляция между серотипами энтеровирусов, определёнными с помощью реакции нейтрализации и секвенирования участка генома VP1.

Следует отметить, что диагностика отдельных случаев заболевания только серологическими методами требует большого количества исследований со всеми известными серотипами энтеровирусов, поэтому её предпринимают только при наличии данных, позволяющих предполагать тип этиологического агента. В практике смеси сывороток готовят по перекрывающей схеме, что позволяет определить большинство наиболее часто встречающихся ЭВ.

Выводы: выявлена прямая зависимость между серотипами энтеровирусов, выявленными с помощью секвенирования участка генома VP1 и реакции нейтрализации специфическими сыворотками. Данные результаты подтверждают высокую чувствительность и специфичность молекулярных методов диагностики. Так же они не требуют длительного периода инкубации и позволяют выявлять вирусы, не размножающиеся в культуре клеток.

## **ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХАНТАВИРУСОВ И ПАРАМИКСОВИРУСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БУРОЗУБОК В РЯЗАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

*Булычева Ю.И.<sup>1</sup>, Бутенко А.М.<sup>1</sup>, Маркина Т.А.<sup>2</sup>, Альховский С.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup>Окский государственный природный биосферный заповедник, Рязанская область, Россия

Грызуны (*Rodentia*) и насекомоядные (*Eulipotyphla*) являются важнейшим природным резервуаром для зоонозных вирусов. Рыжие полёвки (*Myodes glareolus*) являются основным резервуаром для вируса Пуумала (*Hantaviridae*) — возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Также они являются резервуаром нового вируса рыжих полёвок (ВРП, *Paramyxoviridae*), изолированного в Уфе в 1973 году. Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) является резервуаром для нового хантавируса Алтай, изолированного в 2019 году в Новосибирске. Последние исследования показывают, что мелкие грызуны и насекомоядные являются носителями множества РНК-содержащих вирусов. Значение этих вирусов в патологии человека остается неизученным. Целью настоящей работы было определение распространённости парамиксовирусов и хантавирусов среди мелких млекопитающих, а так же детекция новых вирусов с помощью метода полногеномного секвенирования.

Были разработаны гнездовые ПЦР тест-системы для обнаружения РНК новых хантавирусов и парамиксовирусов. С их помощью были обследованы 255 проб органов грызунов и насекомоядных, отловленных в Рязанской области. Было сформировано 6 пулов по 15 образцов для создания ДНК-библиотек для полногеномного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). Обработка данных секвенирования проводилась в программе CLC Genomics Workbench (Qiagen), филогенетический анализ проводился в программе MEGA X. Секвенирование по Сэнгеру проводили на приборе ABI 3500.

В результате полногеномного секвенирования удалось обнаружить фрагменты нескольких геномов — два генома вирусов семейства *Paramyxoviridae* и два генома семейства *Hantaviridae*. Первый парамиксовирус наиболее схож с вирусом Погорье, род

*Jeilongvirus*, 95% схожести при сравнении аминокислотной последовательности РНК-полимеразы. Второй парамиксовирус наиболее схож с вирусами рода *Henipavirus*, изолированными от бурозубки в Китае, 77% схожести при сравнении аминокислотной последовательности матричного белка. Первый хантавирус наиболее схож с вирусом Алтай, род *Orthohantavirus*, 98% схожести при сравнении аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы, нуклеокапсида и гликопротеина. Второй хантавирус наиболее схож с вирусом Сивис, род *Orthohantavirus*, выделенным в Швейцарии, 99% схожести при сравнении аминокислотных последовательностей нуклеокапсида и гликопротеина.

РНК парамиксовирусов была обнаружена в одной из проб от рыжей полёвки, что составило 0,67% от общего количества обследованных проб. РНК хантавирусов была обнаружена в 16 пробах от разных видов мелких млекопитающих, что составило 6,2% от общего количества обследованных проб. Полученные ампликоны (403 п. н.) были секвенированы методом Сэнгера. Генетический анализ изолятов показал, что все обследованные образцы идентичны, и наиболее близки к Алтай-подобному хантавирусу, полученному в результате полногеномного секвенирования.

По итогам проведённого исследования установлена циркуляция нового парамиксовируса Погорье (*Paramyxoviridae*) и хантавируса Алтай (*Hantaviridae*) на территории Рязанской области, для хантавируса Алтай – впервые на территории Европейской части России. Обнаружены фрагменты геномов новых вирусов семейств *Paramyxoviridae* и *Hantaviridae*.

## **РЕАКЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ РПА, КАК ВАЖНЫЙ КОМПОНЕНТ БЫСТРОЙ И ТОЧНОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

***Ведяйкин А.Д.<sup>1</sup>, Алексеев А.А.<sup>1</sup>, Арсениев А.Н.<sup>1</sup>, Воробьёва В.Д.<sup>1</sup>, Бирало Н.В.<sup>1</sup>,  
Кунгурова Л.А.<sup>2</sup>, Мельников А.С.<sup>1</sup>, Сердобинцев П.Ю.<sup>1</sup>, Курдюмова И.В.<sup>1</sup>,  
Криворучко А.Б.<sup>2</sup>, Ходорковский М.А.<sup>1</sup>, Морозова Н.Е.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

Эпидемия, вызванная вирусом SARS-Cov-2, выявила необходимость быстрого и точного тестирования заболевания для предотвращения его бесконтрольного распространения по популяции. В то время как для вируса SARS-Cov-2 на пике эпидемии вопрос тестирования стоял особенно остро, вопрос его диагностики, а также диагностики других социально-значимых заболеваний остаётся актуальным и на данный момент.

Кроме того, бесконтрольное и безответственное применение антибиотиков, а также активное и повсеместное их использование во время пандемии COVID-19, вызванной вирусом SARS-Cov-2, привело к возникновению множества патогенных штаммов бактерий, устойчивых к большому числу антибиотиков. Зачастую, микробиологические подходы, используемые для диагностики бактериального патогена, вызывающего заболевание и

оценки его чувствительности к различным типам антибиотиков, занимает длительное время, которое уменьшает шансы больного на успешное лечение бактериальной инфекции.

Поэтому быстрая, простая и точная диагностика заболеваний, вызванных вирусами или бактериями, а также быстрая оценка степени устойчивости микроорганизмов к различным типам антибактериальных препаратов является чрезвычайно актуальной задачей.

Самым чувствительным на сегодняшний день, является метод ПЦР диагностики, в том числе, ПЦР диагностики в режиме реального времени. Однако данный метод нельзя отнести к категории экспресс-тестирования, он требует наличия специализированного оборудования и высококвалифицированного персонала для корректного проведения тестирования.

Среди принципиально новых методик, позволяющих детектировать инфекционный агент, определённый ген (например, ген устойчивости к антибиотику), мутацию в геноме вируса или бактерии в пробе, можно выделить подходы, основанные на использовании систем CRISPR-Cas в диагностических целях. В основе таких методов лежит явление неспецифической коллатеральной активности, характерной для некоторых Cas-нуклеаз и приводящей к расщеплению односторонних флуоресцентных зондов в образце после распознавания ДНК-мишени вируса или бактерии. Этот подход позволяет получить высокую чувствительность диагностики, так как сформировавшийся эффекторный комплекс Cas-нуклеазы способен расщепить множество односторонних молекул ДНК.

Однако использование одной только системы CRISPR-Cas, не позволяет достигнуть степени чувствительности диагностики, сравнимой с чувствительностью ПЦР-тестирования. Для её повышения, в таких тест системах должны применяться методы изотермической амплификации, позволяющие эффективно увеличить количество ДНК-мишеней в образце без использования дополнительного оборудования.

На данный момент насчитывается несколько различных подходов, позволяющих проводить амплификацию ДНК при одной фиксированной температуре и без использования амплификатора. Самым перспективным из них является метод рекомбиназно полимеразной амплификации (РПА), позволяющий быстро реплицировать линейные фрагменты ДНК при температуре в диапазоне от 25°C до 42°C. Однако на текущий момент в России не зарегистрировано коммерчески-доступной системы изотермической амплификации РПА, а в мире существует всего несколько производителей таких систем.

Данная работа посвящена созданию эффективной системы изотермической амплификации РПА, полностью состоящей из самостоятельно выделенных и очищенных белковых компонентов, наэкспрессированных с самостоятельно созданных генетических конструкций. Нам удалось создать генетические конструкции, позволяющие эффективно экспрессировать и выделять необходимые компоненты описанной системы РПА. После получения активных препаратов всех требуемых ферментов, нами была проведена оптимизация условий проведения реакции, позволившая получать высокий уровень амплификации. Такая система сама по себе может быть использована, как способ амплификации ДНК, применимый в диагностических целях. Кроме того, при дополнении её Cas-нуклеазой с коллатеральной активностью, РПА может быть использована для высокочувствительной диагностики вирусных и бактериальных патогенов, а также конкретных значимых мутаций в ДНК вирусов и бактерий.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках программы «Приоритет 2030» (Соглашение № 075-15-2024-201 от 6 февраля 2024 г.).

## **РАЗРАБОТКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ТИПА В С РАСШИРЕННЫМ СПЕКТРОМ ЗАЩИТЫ**

*Вон П.Ф., Баженова Е.А., Степанова Е.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

*ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия*

Вирусы гриппа типа В (ВГВ) считаются основными возбудителями сезонных эпидемий острых респираторных заболеваний у людей, что представляет серьезную угрозу для общественного здоровья. Современные лицензированные вакцины против гриппа включают четыре компонента: штаммы вируса гриппа А (подтипы H1N1 и H3N2) и два штамма вируса гриппа В линий В/Виктория и В/Ямагата, которые характеризуются низкой перекрестной реактивностью. Однако исследования показали, что включение четвертого компонента в состав живых гриппозных вакцин приводит к снижению их иммуногенности и эффективности по сравнению с трехвалентными вакцинами, включающими только один штамм ВГВ. Следовательно, разработка вакцинного штамма живой гриппозной вакцины типа В, обладающего перекрестной реактивностью по отношению к обеим линиям ВГВ, является актуальной задачей современной медицинской науки.

В настоящем исследовании была использована разработанная нами ранее обратнo-генетическая система для холодоадаптированного штамма В/СССР/60/69 – донора аттенуации для живой гриппозной вакцины (ЖГВ), с целью конструирования штамма, эффективного в отношении вирусов гриппа В обеих генетических линий. Для этого был сконструирован рекомбинантный вирус гриппа типа В, экспрессирующий химерную молекулу НА (сНА), которая состоит из глобулярного домена вируса линии В/Виктория и домена «ножки» (stalk-домен) от вируса линии В/Ямагата. Для индукции stalk-реактивных антител использовали стратегию последовательной иммунизации мышей линии С57ВL/6J, при которой мышам сначала вводили классический штамм ЖГВ линии В/Ямагата, а бустирование проводили сконструированным рекомбинантным вирусом с химерным геном сНА. В качестве контрольной группы выступали животные, последовательно иммунизированные классическими штаммами ЖГВ линии В/Ямагата (1-я доза) и В/Виктория (2-я доза). Также в исследование были включены группы животных, получивших две дозы гомологичных вакцинных вирусов либо линии В/Виктория, либо линии В/Ямагата. Сыворотки крови собирали через 3 недели после второй дозы и иммунный ответ оценивали в иммуноферментном анализе как против цельных ВГВ, так и к рекомбинантному химерному белку НА, глобулярная часть которого была заимствована от вируса гриппа А/Н8N4, а stalk-домен – от вируса В/Ямагата. Защитный эффект вакцинации оценивали путем заражения мышей вирулентными ВГВ обеих генетических линий.

Последовательная иммунизация мышей гетерологичными вакцинными штаммами вызывала образование более высоких уровней сывороточных IgG антител к вирусным антигенам, содержащим стеблевой домен НА от вируса В/Ямагата, чем введение гомологичных вакцинных штаммов ЖГВ. В целом, стратегия вакцинации штаммом, содержащим сНА, приводила к выработке антител против более широкого спектра разнообразных вирусов гриппа В, включая неродственные вирусы линий В/Ямагата и В/Виктория, а также устаревший модельный штамм В/Lee/40.

В целом, иммунизация всеми экспериментальными вакцинными штаммами



обеспечивала некоторый уровень перекрестной защиты животных от заражения гетерологичными вирусами гриппа В, за исключением группы, получившей две дозы ЖГВ линии В/Ямагата – в данном случае защита в отношении вируса линии В/Виктория была недостаточно выраженной. Более высокую степень перекрестной защиты показал режим иммунизации гетерологичными классическими штаммами ЖГВ, при этом защитный эффект далее повышался при использовании химерного штамма ЖГВ в качестве бустерной вакцины. В целом, полученные данные указывают на то, что вакцинация с использованием рекомбинантных вирусов гриппа В, экспрессирующих химерные молекулы НА, является перспективной стратегией для повышения спектра защитного действия вакцинных штаммов ЖГВ от заражения ВГВ и может способствовать разработке более эффективной противогриппозной вакцины.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00070.

## **ЭТИОЛОГИЯ ТОРИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 ПО ДАННЫМ СИГНАЛЬНОГО НАДЗОРА**

*Дорош А.В., Смородинцева Е.А., Столяров К.А.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

В системе Сигнального надзора (СН) за гриппом, COVID-19 и другими ОРВИ в РФ проведен анализ этиологической структуры тяжелой острой респираторной инфекции (ТОРИ) у госпитализированных больных в 2020-2024 гг.

Материалы и методы. СН проводится на основе индивидуальных карт больных ТОРИ.

За период с 40 недели 2020 по 12 неделю 2024 года в базу данных СН поступали данные о больных ТОРИ, обследованных на грипп (11022 больных) и COVID-19 (9343 больных) из 7 городов страны, других ОРВИ (парагрипп, аденовирусная, респираторно-синцитиальная, риновирусная, бокавирусная и метапневмовирусная инфекции) (6816 больных) - из 4 городов. Детекция вирусов проводилась методом rRT-PCR.

Результаты. Появление в 2019 году нового коронавируса SARS-CoV-2 привело к вытеснению из циркуляции вирусов гриппа в 2020-2021 эпидемическом году и отсутствию в эпидсезоне 2020-2021 гг. эпидемии гриппа в России. Однако, уже осенью 2021 года в системе СН были зарегистрированы первые случаи гриппа А(Н3N2), а уже с ноября 2021 года – резкий рост частоты диагностирования, что говорило о начале эпидемии гриппа. Кроме того, у больных ТОРИ были зарегистрированы единичные случаи гриппа типа В, которые выявляли вплоть до конца мая 2022 года. Летом и в сентябре 2022 года вирусы гриппа у больных ТОРИ не регистрировали, с октября 2022 года были диагностированы первые случаи гриппа А(Н1N1)pdm09, а затем и гриппа типа В. Смешанная эпидемия гриппа А(Н1N1)pdm09 и В была зарегистрирована в ноябре 2022 года. ТОРИ, обусловленные гриппом, выявляли вплоть до мая 2023 года. В 2023-2024 эпидсезоне эпидемия гриппа А(Н3N2) началась также в ноябре 2023 года и продолжалась вплоть до марта 2024 года. В

целом доля гриппа среди больных ТОРИ в эпидсезоны составила 6.3%, 11.0%, 7.8% в 2021-22, 2022-23 и 2023-24 гг., соответственно.

В эпидемическом сезоне 2020-2021 года вирус SARS-CoV-2 у больных ТОРИ доминировал, его регистрировали во все недели, частота диагностирования в целом достигала 31,9% от обследованных больных ТОРИ. В 2021-2022 гг. частота детекции вируса SARS-CoV-2 была значительно ниже – 16,1%, в сезон 2022-2023 годов, новый коронавирус у больных ТОРИ регистрировали всё реже – в 4.1%.

Еженедельный мониторинг других ОРВИ (парагрипп, аденовирусная, респираторно-синцитиальная, риновирусная, бокавирусная и метапневмовирусная инфекции) показал, что в начале эпидсезона 2020-2021 годов вирус SARS-CoV-2 заместил большую часть вирусов ОРВИ. Не было зарегистрировано ежегодного осеннего сезонного подъёма заболеваемости ОРВИ. Однако, уже с марта 2021 года вирусы ОРВИ стали возвращаться в циркуляцию, летом 2021 года они вызывали до 50% и более случаев ТОРИ. В осенние месяцы 2021, 2022 и 2023 годов были выявлены сезонные подъёмы частоты диагностирования ОРВИ. В целом, частота диагностирования ОРВИ составила 27,4%, 23,9% и 22,1% в 2020-2021, 2021-2022 и 2022-2023 гг., соответственно.

Вывод. Новый коронавирус SARS-CoV-2 практически вытеснил из циркуляции вирусы гриппа и значительно подавил активность вирусов ОРВИ осенью и зимой 2020 года. С весны 2021 года в активную циркуляцию вернулись сначала вирусы ОРВИ, а затем и вирусы гриппа, вызвав последовательно три сезонные эпидемии в 2021-2024 годах.

Частота выявления вируса SARS-CoV-2 у больных ТОРИ постепенно снижалась вплоть до осени 2023 года.

С конца 2021 года частота детекции ОРВИ достоверно ( $p < 0,05$ ) превышала частоту выявления вируса SARS-CoV-2.

## **ПОСЛОЙНАЯ МОДИФИКАЦИЯ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОДНОРАЗОВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ К ПАТОГЕНАМ**

*Евдокимов А.А., Балдина А.А., Скорб Е.В.*

*Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

Своевременное обнаружение патогенных микроорганизмов, таких как вирусы, бактерии, позволяет своевременно предупредить распространение инфекции и минимизировать расходы, связанные с мониторингом. Компактные устройства для детектирования патогенов позволяют решить эту задачу в полевых условиях. Одними из таких устройств являются одноразовые электрохимические сенсоры на базе печатных (изготавливаемых трафаретной печатью) электродов.

На рабочей поверхности печатного электрода создаётся селективный слой, чувствительный к определённому патогену (рисунок 1). Селективность будущего сенсора достигается за счёт создания сборки «антитело-антиген-антитела с конъюгированным ферментом» (в зарубежной литературе – «sandwich immunoassay»). Антитела, специфичные к выбранному патогену, и сам антиген осаждаются в полиэлектrolитной матрице из

противоположно заряженных полиэтиленimina (PEI) и полистиролсульфоната натрия (PSS). Такая послойная матрица позволяет одновременно и зафиксировать антитела за счёт электростатических сил, и сохранить доступ антигена к ним. Антитела, закрывающие антиген и конъюгированные с ферментом (пероксидазой хрена), позволяют определить количество специфично связанного антигена. При использовании сенсора пероксидаза хрена восстанавливает содержащуюся в пробе перекись водорода до воды, что может быть зарегистрировано в виде увеличения значения тока (пика) на вольтамперметрической кривой. По величине этого пика можно судить о концентрации осаждённого антигена, относящегося к патогенному микроорганизму.

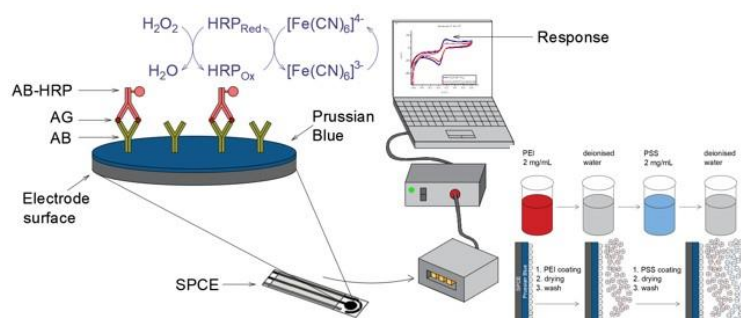


Рисунок 1. Изготовление иммуносенсора на основе печатного электрода

Ранее в стенах НОЦ инфохимии Университета ИТМО уже опробованы электрохимические иммуносенсоры на основе углеродсодержащих электродов для определения вируса клещевого энцефалита, а также имеются наработки по детектированию золотистого стафилококка.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЛЕЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСОВ ГРИППА В ВИКТОРИАНСКОЙ ЛИНИИ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 (2020-2023 ГГ.)

*Желтухина А.И., Бояринцева А.Ю., Мусаева Т.Д., Фадеев А.В.,  
Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Первые вирусы гриппа В Викторианской линии, несущие двойные и тройные делеции в молекуле гемагглютинаина, в России были зарегистрированы в 2018 году, полностью вытеснив собой Брисбен-подобные штаммы, которые циркулировали до этого на протяжении десяти лет. В данном исследовании представлены данные по антигенным и генетическим свойствам вирусов гриппа В Викторианской разновидности, циркулировавшим в период пандемии COVID-19.

В 2019-2020 гг. по всему миру начали регистрироваться случаи заболевания вирусами гриппа В, подобного штамму В/Вашингтон/02/2019, та же самая картина наблюдалась и в России, при этом вирусы гриппа В являлись доминирующей группой. На тот момент в состав

вакцин в качестве компонента по гриппу В был утвержден штамм В/Колорадо/07/2017, который является двойным делеционным вариантом и циркулировал ранее, в то время как В/Вашингтон/02/2019 несет тройную делецию в молекуле гемагглютинина, поэтому можно говорить лишь о частичном соответствии вакцинного и эпидемического штаммов в сезон 2019-2020 гг. Интересно отметить, что в сезон 2018-2019 гг. были выявлены вирусы, подобные референс-штаммам В/Гонконг/269/2017 и В/Кот Д'Ивуар/1662/2018, однако в дальнейшем они не регистрировались. Для изолятов, циркулировавших в эпидемическом сезоне 2019-2020 гг. по данным филогенетического анализа было выявлено несколько генетических подгрупп. Первая из них имела замену 4 аминокислот, включая две позиции в следующих антигенных сайтах: петля-150 (N150K) и спираль-190 (N197D), при этом последняя приводила к потере потенциального сайта гликозилирования. Вирусы этой подгруппы были выделены в декабре 2019 г. - марте 2020 г. в 3 различных регионах Российской Федерации (Санкт-Петербург, Хабаровск, Москва). Другая группа, которую можно отметить, включала вирусы из Гурзуфа и Москвы с заменой N233K, также ведущей к потере потенциального сайта гликозилирования. Кроме того, была выявлена группа из 19 вирусов, выделенных в Санкт-Петербурге и Калининграде с заменой N126S в антигенном сайте петля-120.

В сезон 2020-2021 гг. на фоне пандемии COVID-19 циркуляция вирусов гриппа В России практически не регистрировалась, однако, удалось выявить два случая заболевания гриппом В и выделить из них штаммы – оба вируса были подобны штамму В/Вашингтон/02/2019, который также входил в состав противогриппозных вакцин того сезона. Но стоит отметить, что данные изоляты лучше взаимодействовали с антисывороткой к референс-штамму В/Род Айлэнд/01/2019, отличительной особенностью которого является замена N150K в молекуле гемагглютинина – именно такие делеционные варианты в настоящее время повсеместно распространены по миру. Сейчас мы наблюдаем разделение вирусов гриппа В Викторианской линии на несколько генетических групп, среди них распространение получили вирусы гриппа В, подобные референс-штамму В/Австрия/1359417/2021, который на данный момент входит в состав противогриппозных вакцин. Подобные штаммы также регистрируются по всему миру. При этом продолжается разделение внутри генетических групп, выявляются штаммы с заменами в молекуле НА в антигенных сайтах, однако по антигенным свойствам существенных различий между штаммами не выявлено, как и в сезон 2021-2022 гг.

Таким образом, за период пандемии COVID-19 для вирусов гриппа В Викторианской наблюдалась циркуляция вирусов, несущих тройную делецию в молекуле НА и полностью сменивших собой ранее циркулировавшие варианты. Внутри делеционных вариантов наблюдалось генетическое разнообразие, однако антигенные свойства вирусов, относящихся к разным генетическим группам, не сильно отличались, что свидетельствует о необходимости совершенствования серологических методов для более точного анализа вариантов, выступающих кандидатами в состав противогриппозных вакцин.

## ГЕНОТИПЫ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА, ВЫЯВЛЕННОГО У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

*Иголкина А.А.<sup>1</sup>, Кусакин А.В.<sup>1</sup>, Маркин И.В.<sup>1</sup>, Голева О.В.<sup>1</sup>, Чухловин А.Б.<sup>2</sup>, Базиян Е.В.<sup>1</sup>,  
Эйсмонт Ю.А.<sup>1</sup>, Rogozina Н.В.<sup>1</sup>, Васильев В.В.<sup>1</sup>, Глотов О.С.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. В Российской Федерации частота серопозитивности к цитомегаловирусу (ЦМВ) составляет от 50% до 80%, но наибольшая настороженность связана с инфицированием этим вирусом женщин детородного возраста. Для женского населения, инфицирование цитомегаловирусом которых произошло в период беременности, существует риск вертикальной передачи вируса плоду с развитием внутриутробной (ВУИ) цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ), которая может стать причиной формирования тяжелых пороков у плода. Исходы внутриутробной ЦМВИ зависят от многих факторов, в том числе в каком триместре произошло заражение; от иммунного статуса женщины; характера течения инфекции. По-прежнему актуальными являются вопросы, касающиеся роли генотипа вируса в вертикальной передаче и тяжести течения врожденной ЦМВИ. Для генома цитомегаловируса характерна вариабельность, которая может приводить к генотипическим комбинациям вируса. Изучение эволюции штаммов на популяционном уровне, одна из основных тем для разработки алгоритмов прогноза ВУИ, применения профилактических мер и противовирусной терапии.

Цель. Определение генотипов вируса, выявленного у беременных и новорожденных с ЦМВИ.

Материалы и методы. Проанализированы образцы крови, слюны, мочи у 2 женщин, переносящих ЦМВИ во время беременности, и у 16 новорожденных с врожденной ЦМВИ. Из биоматериалов выделялась тотальная ДНК; качественная детекция ДНК ЦМВ проводилась в режиме real-time PCR. В соответствии с внутренними критериями отбора образцов на основе определения концентрации выделенной ДНК, для генотипирования ЦМВ было отобрано 30 образцов. Секвенирование участков генома ЦМВ выполнено с применением технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе MiSeq (Illumina, США). Подбор праймеров для генотипирования осуществлялся с помощью программы «Primer Express». Были выбраны вариабельные участки, кодирующие гликопротеины оболочки вируса UL55 gB, UL73 gN, UL75 gH. В качестве референс-последовательностей на основании литературных данных были выбраны последовательности генов: FJ616285.1, X17403.1, M85228.2, M60926.2, MK157465.1, KY490076.1, KF021605.1, AF309974.1, AF309975.1, AF309980.1, EU686430.1, AF309988.1, AF224677.1, AF310006.1 Анализ данных проводился с помощью биоинформатических программ: анализ качества ридов - FastQC и MultiQC; таксономическая классификация - Kraken2, Kaiju; картирование ридов на референс-последовательность – BWA; визуализация картированных ридов – IGV.

Результаты. Из 30 образцов ДНК, выделенных из исследуемых биоматериалов, удовлетворительное покрытие при секвенировании генома ЦМВ было выполнено в регионе

UL55 в 10 образцах; в регионе UL73 в 17 образцах; в регионе UL75 в 14 образцах. Все 3 региона с удовлетворительным покрытием было в 10 образцах. При анализе результатов секвенирования в регионе UL55 выявлены генотипы gB3, gB7 (но близко схожий с gB1), gB4. Генотип gB7 определен в 50% проб. В регионе UL73 - генотипы gN1, gN2, gN3a, gN4b, gN4c. Генотип gN4c был наиболее распространен и встречался в 52% проб. В регионе UL75 определены генотипы gH1 и gH2; доля gH1 преобладала в 57% проб. При анализе связи клинической картины с выявленными генотипами ЦМВ находкой было то, что у новорожденных пациентов с клиническими проявлениями поражения ЦНС генотип gB7 в регионе UL55 подтвержден в 100% случаев.

Выводы. Анализ вариабельных участков цитомегаловируса (UL55 gB, UL73 gN, UL75 gH), выделенного у беременных и новорожденных в Санкт-Петербурге, проиллюстрировал преобладающие генотипы: gB7 (50% случаев) и gH1 – (57% случаев). Обнаружено в 100 % случаев связь клинической картины с поражением ЦНС и выявленным генотипом gB7 в регионе UL55 ЦМВ у новорожденных пациентов. Дальнейшие исследования будут направлены на расширения выборки и поиска корреляционных связей между генотипом ЦМВ и вертикальной передачей вируса.

## **ИММУНОГЕННОСТЬ И КРОСС-ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН В РЕЖИМЕ ПРАЙМ-БУСТ ИММУНИЗАЦИИ *IN VIVO***

*Камрансарканди М., Шурыгина А.-П.С., Шуклина М.А., Романовская-Романько Е.А.,  
Пулькина А.А., Ожерельева О.О., Сергеева М.В., Бузицкая Ж.В.,  
Стукова М.А., Варюшина Е.А.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», Санкт-Петербург, Россия*

Вакцинация является наиболее эффективной и безопасной стратегией профилактики гриппа и его осложнений. Известно, что инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) вызывают преимущественно гуморальный иммунный ответ, в то время как живые аттенуированные гриппозные вакцины активируют как гуморальный, так и Т-клеточный иммунитет на системном и мукозальном уровнях. Целью нашей работы являлось изучение поствакцинального иммунного ответа и защитной эффективности при гетерологичном заражении мышей на фоне вакцинации прототипами ИГВ и живой вакцины на основе вируса гриппа с транкированным NS1 белком (ЖГВ) в режиме прайм-буст иммунизации.

Мышей линии C57BL/6 (самки, 6-8 недель) внутримышечно праймировали прототипом четырехвалентной ИГВ. Иммунизированные животные через 21 день были разделены на три группы (n = 30 в каждой группе): группа 1 была бустирована ИГВ внутримышечно, группа 2 - ИГВ внутримышечно плюс моновалент ЖГВ (подтип A/H1N1pdm09) интраназально, группа 3 - ЖГВ (подтип A/H1N1pdm09) интраназально. В качестве контрольной группы использовали невакцинированных мышей (группа 4, n = 30). На 42-й день после первой иммунизации мышей во всех четырех группах заражали гетерологичным штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Уровень антител в сыворотке крови оценивали через 20 дней после каждой иммунизации и через 3 дня после заражения в

реакциях торможения гемагглютинации (РТГА) и микронеutralизации (РНН). Оценку АГ-специфического CD4+/CD8+ Т-клеточного ответа проводили на 20-й, 28-й, 40-й дни после иммунизации и через 3 дня после заражения методом проточной цитометрии. Были выделены субпопуляции цитокин-продуцирующих (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, TNF $\alpha$ ) эффекторных Т-клеток памяти (ТЕМ) в легких и селезенке и Т-резидентных клеток памяти (Т<sub>RM</sub>) в легких, а также субпопуляции тимических (tTreg) и периферических (pTreg) Т-регуляторных клеток в легких и селезенке. Определение вирусного титра в образцах бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и гистологическое исследование легких выполняли через 3 дня после заражения.

Согласно полученным результатам, повышение уровня антител к компоненту вакцины А/Н1N1 наблюдали независимо от схемы вакцинации. Как и ожидалось, в группе 3 не происходило усиления антительного ответа на компонент вакцины А/Н3N2. Тем не менее, самый высокий уровень защиты при гетерологичном заражении отмечен в группах 2 (100% выживаемость) и 3 (90% выживаемость), бустированных ЖГВ. При этом, в группах 1 (буст ИГВ) и 4 (контроль) выжили только 30% мышей. По сравнению с контрольной группой, титры вируса в БАЛ после заражения снизились во всех вакцинированных группах. При этом наиболее выраженное снижение наблюдали в группе 2 (ИГВ→ЖГВ) по сравнению с группой 4 (контроль) (3,9 vs 5,21 log TCID50/0.1; p<0,01). В группах 2 и 3, получивших бустирование ЖГВ, было отмечено формирование полифункциональных CD4+/CD8+ Т-клеток в легких иммунизированных мышей. Кроме того, после заражения у мышей группы 3 в легких отмечено появление полифункциональных IFN $\gamma$ /IL-10-продуцирующих CD8+ Т<sub>RM</sub> клеток, а также увеличение относительного количества pTreg в легких и tTreg в селезенке.

Можно заключить, что бустирование прототипом интраназальной живой гриппозной векторной вакцины усиливает защиту при заражении гетерологичным штаммом вируса гриппа. Защитная эффективность при этом обусловлена, как стимуляцией поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа в респираторном тракте иммунизированных животных, так и активацией регуляторных Т-клеток, ограничивающих развитие избыточной воспалительной реакции на фоне заражения.

## **ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А(Н1N1)PDM09**

*Карташова А.А.<sup>1</sup>, Мухаметдинова Д.В.<sup>2</sup>, Марченко В.А.<sup>3</sup>, Жилинская И.Н.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup>*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Цель: изучить гистопатологические изменения в кровеносных сосудах легких крыс при инфекции, вызванной вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.

Материалы и методы: эксперименты выполняли на 40 крысах линии Вистар (самцах) в возрасте 4–6 недель, весом 200-250 грамм. Животных из всех опытных групп (n=5) интраназально инфицировали вирусом гриппа А/СПб/48/16 (Н1N1)pdm09 (rat-adapted). Через

1, 4, 7, 14, 21, 30 и 60 дней после инфицирования животных подвергали наркотизации и эвтаназии с последующим выделением легких. В качестве контроля выступали интактные животные (n=5).

Для изучения гистопатологических изменений ткани левого легкого крыс фиксировали в формалине в течение 24 ч. Гистологическую проводку осуществляли с использованием автоматического процессора замкнутого типа в изопропанол. С готовых парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм, после чего их депарафинизировали в ксилоле, дегидратировали в спиртах и окрашивали гематоксилином и эозином.

Ткани правого легкого использовали для определения инфекционного титра вируса гриппа. С этой целью ткани подвергали гомогенизации, после чего гомогенат осаждали при помощи центрифугирования. Инфекционную активность вируса определяли в куриных эмбрионах по методу Рида-Менча.

Для подтверждения репликации вируса в тканях и кровеносных сосудах легких использовали иммуногистохимический анализ с использованием моноклональных антител к нуклеопротеину вируса гриппа.

Результаты: инфекционную активность вируса в тканях легких крыс определяли на протяжении первых 4-х дней после заражения. Так, через 1 день после инфицирования титр вируса составлял 6,7 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, а спустя 4 дня – 2,2 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Через 7 дней после инфицирования и на всех последующих временных интервалах вирус гриппа в тканях легких крыс не обнаруживали. В тканях легких крыс из группы контроля инфекционную активность вируса также не выявляли.

Иммуногистохимический анализ позволил выявить нуклеопротеин вируса гриппа в тканях и кровеносных сосудах легких крыс через 1 и 4 дня после заражения, что подтверждает данные по определению инфекционной активности вируса гриппа в тканях легких.

Со стороны кровеносных сосудов легких инфицированных крыс регистрировали различные гистопатологические изменения на протяжении первых 14 дней. Так, спустя 1 день после инфицирования обнаруживали следующие изменения: спазм сосудов разного калибра, десквамацию и набухание ядер эндотелиоцитов, набухание ядер эндотелиоцитов (преимущественно в венах), изменение морфологии эндотелия по типу «частокола», отек и дезорганизацию адвентиции, в просвете сосудов – нити фибрина и сладж эритроцитов. Через 4, 7 и 14 дней изменения носили менее выраженный характер и, как правило, касались микроциркуляторного русла (преимущественно венул). Спустя 21, 30 и 60 дней после заражения гистопатологических изменений со стороны кровеносных сосудов легких не наблюдали.

Выводы: вирус гриппа A(H1N1)pdm09 вызывает гистопатологические изменения со стороны кровеносных сосудов легких разной степени выраженности на протяжении 14-ти дней.



## ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ КОНЬЮГАТОВ 7-ГИДРОКСИКУМАРИНА И ТЕРПЕНОИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В ОТНОШЕНИИ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

*Клабуков А.М.<sup>1</sup>, Галочкина А.В.<sup>1</sup>, Разгуляева Д.Н.<sup>1</sup>, Цыпышев Д.О.<sup>2</sup>,  
Волчо К.П.<sup>2</sup>, Штро А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) является частой причиной острых респираторно-вирусных инфекций (ОРВИ). К группе высокого риска относятся дети раннего возраста, у которых ОРВИ стоят на первом месте среди причин детской смертности от инфекционных заболеваний. РСВ вызывает поражение преимущественно нижних дыхательных путей с развитием бронхитов, бронхиолитов и пневмоний. Несмотря на то, что производятся попытки разработать эффективный препарат против РСВ, единственным этиотропным средством является рибавирин, который обладает существенными побочными эффектами, что не позволяет использовать его в большинстве клинических случаев. Препараты на основе моноклональных антител, обладают высокой стоимостью и эффективны только при профилактическом приеме. Таким образом, в настоящий момент существует необходимость поиска и разработки новых лекарственных препаратов для терапии респираторно-синцициального вируса.

В предыдущих исследованиях было показано, что такие соединения, как конъюгаты монотерпена и кумарина, проявляют ингибирующую активность в отношении РСВ. Также результаты экспериментов «время добавления» показали, что конъюгаты монотерпен-кумарин работают на начальном этапе жизненного цикла вируса. В рамках данного исследования была изучена серия из 23 новых монотерпен-кумариновых конъюгатов, связанных триазольными линкерами, из кумаринов, отожденных с карбоциклами, а также модифицированных по четвертому положению и различных ациклических и бициклических терпеноидов, а также фрагмента кумильного типа.

Противовирусная активность и цитотоксичность препаратов изучалась на культуре клеток Нер-2. Противовирусную активность оценивали путем добавления серии 3-кратных разведений тестируемых соединений с последующим добавлением вируса в серии 10-кратных разведений. Клетки инкубировали в течение 1 часа; затем вирус отмывали и снова добавляли соединения. Затем клетки инкубировали в течение 6 дней, после чего измеряли количество вируса с помощью ИФА. Механизм действия наиболее активных соединений был изучен при помощи методики «время добавления».

Таким образом, в результате исследования были обнаружены 6 активных в отношении РСВ препаратов. Шесть исследуемых препаратов с наибольшим химиотерапевтическим индексом (ХТИ) в отношении РСВ А2, также показали противовирусную активность в отношении РСВ В.

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА ФИБРИЛЛЫ АД5КНОВ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВЕКТОРУ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА 5 ТИПА

*Коклюшкина А.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Амосова И.В.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время широко применяются рекомбинантные вакцины на основе аденовирусных (Ад) векторов, использование которых обусловлено их естественным механизмом взаимодействия с клетками человека и длительной экспрессией целевого антигена. Однако Ад векторы также могут вызывать сильный иммунный ответ. Это один из возможных побочных эффектов большинства векторных вакцин на основе Ад. Исследование иммуногенных свойств Ад-векторов и оценка их влияния на эффективность презентации целевого антигена являются необходимым этапом при разработке и внедрении новых векторных вакцин. Изучение динамики изменения титров нейтрализующих антител к вектору Ад 5 типа (Ад5) после вакцинации проводят в реакции нейтрализации (РН) с использованием живого вируса. Применение типоспецифического синтетического фрагмента белка фибриллы Ад5 (Ад5Кнов) в иммуноферментном анализе (ИФА) позволило бы отказаться от использования живого вируса, существенно сократить сроки проведения и себестоимость анализа.

Цель: изучение динамики изменения уровня антител, образующихся в ответ на введение вакцины на основе Ад5 вектора, в ИФА.

Материалы и методы. Парные сыворотки 100 человек, полученные на «0» и «28» день после вакцинации рекомбинантной вакциной на основе Ад5 вектора (82 пары сывороток от вакцинированных добровольцев и 18 пар сывороток из группы «плацебо») исследовали на прирост уровня IgG к Ад5 в ИФА. В качестве антигена использовали белок Ад5Кнов в концентрации 1 мкг/мл. Для верификации исследования использовали тест-систему ИФТС-IgG-ОРВИ (ООО «ППДП», Россия), в которой в качестве антигена используется очищенный Ад5 в концентрации 2,5 мкг/мл. Сыворотки использовали в рабочем разведении 1:800, определенном в предварительных опытах. Диагностически достоверным считали увеличение значения ОП450 в сыворотке, полученной на «28» день по сравнению с сывороткой дня «0» на 0,4 и более оптических единиц.

Результаты. В ИФА использовали сыворотки, ранее исследованные в РН на наличие нейтрализующих антител к Ад5. По результатам РН из 82 пар сывороток вакцинированных добровольцев в 40 случаях кратность прироста уровня нейтрализующих антител к Ад5 была диагностически достоверной и составила от 4 до 128 раз, в 42 случаях прирост уровня нейтрализующих антител не превышал 2-х кратного значения либо отсутствовал. Все сыворотки группы «плацебо» были отрицательны.

Достоверный прирост уровня антител к Ад5 в ИФА при использовании в качестве антигена белка Ад5Кнов и тест-системы ИФТС-IgG-ОРВИ был выявлен в 25/40 и 21/40 пар сывороток, положительных по приросту нейтрализующих антител к Ад5 в РН, соответственно. В остальных, положительных по результатам РН, сыворотках прирост уровня антител к Ад5 был незначительным либо отсутствовал при использовании обеих тест-систем. Дополнительно, в сыворотках, отрицательных по результатам РН, было

выявлено 13/42 и 14/42 случаев сероконверсий при использовании в качестве антигена белка Ад5Кноб и тест-системы ИФТС-IgG-ОРВИ, соответственно.

Анализ результатов по данным ИФА с использованием белка Ад5Кноб и очищенным Ад5 в положительных по РН сыворотках свидетельствует о специфическом выявлении антител, образовавшихся в ответ на введение Ад5-вектора, а выявление дополнительных сероконверсий может быть обусловлено более высокой чувствительностью ИФА по сравнению РН.

Выводы. Использование синтетического фрагмента белка фибриллы Ад5Кноб в ИФА позволяет выявлять антитела, образовавшиеся к вектору Ад5, тогда как в РН выявляется широкий спектр нейтрализующих антител образовавшихся как к ранее перенесенной Ад инфекции, так и к вектору Ад5. Необходимо дальнейшее изучение свойств белка Ад5Кноб при выявлении антител, образующихся к Ад5-вектору, для подтверждения возможности использования ИФА в качестве альтернативы РН.

## **ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ И СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА МЫШАХ И КРЫСАХ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19**

*Кондратьева В.М., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Гребенникова Т.В.*

*ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия*

Большинство патогенов проникают в организм через слизистые оболочки. Пандемия COVID-19 продемонстрировала необходимость создания вакцин с защитой в месте проникновения патогена, предотвращая инфекцию и ее распространение. Интраназальная вакцинация стимулирует как системный, так и местный иммунитет. Более того, такой путь введения повышает комплаентность пациентов, особенно детей, и позволит добиться максимально быстрой иммунизации всего населения.

Перспективным подходом иммунизации является использование вирусоподобных частиц (VLP). VLP — это самособирающиеся белковые структуры, имитирующие нативные вирионы, которые лишены геномного материала. Малый размер частиц (100-200 нм) обеспечивает их проникновение через барьер слизистой оболочки. Рекомбинантные VLP, состоят из структурных белков М, N, Е и поверхностного белка S вариантов 19А, Альфа, Дельта и Омикрон, позволят решить проблемы, связанные с высокой генетической изменчивостью коронавирусов.

Токсикологический анализ на мышах и крысах позволяет получить наиболее полную информацию о безопасности тестируемых препаратов в доклинических исследованиях.

Исследования острой токсичности проводили на 60 мышах (30♀ и 30♂), а субхронической на 90 крысах (45♀ и 45♂). Мышам интраназально вводили одну прививочную дозу, превышающую дозу для человека более чем в 2000 раз, затем 14 суток за животными вели ежедневное наблюдение, на 15 сутки проведена эвтаназия. Крыс иммунизировали трижды одной прививочной дозой препарата (80 мкг) и удвоенной (160 мкг), с интервалом между введениями 21 день. После последнего введения вакцины

проводили эвтаназию части животных из каждой группы через сутки, а оставшихся - на 58 день.

Был проведен качественный и количественный анализ токсических проявлений, оценка физиологических и патологоанатомических изменений после многократного введения вакцины, и определение зависимости этих изменений от дозы антигена.

На протяжении всего эксперимента гибели и клинической картины интоксикации животных не было. Масса тела животных на протяжении эксперимента значимо не различалась между группами. Прибавка веса у мышей составила: ♀0,7 г, ♂2,4 г и ♀1,7 г, ♂2,9 г у вакцинированных и контрольных животных, соответственно. Прибавка веса у вакцинированных крыс в дозах 80 мкг и 160 мкг составила: ♀38,8 г, ♂27,7 г и ♀31,9 г, ♂50,6 г, соответственно, и у контрольных животных ♀31,0 г и ♂42,2 г.

При вскрытии животных не наблюдали негативного воздействия вакцины на массу и структуру органов. При проведении теста «Открытое поле» не было изменений в поведении и общем состоянии животных. Показатели гемостаза, биохимического анализа крови и анализа мочи у животных, получавших вакцину интраназально в обеих исследуемых дозах, были аналогичны показателям контрольных групп. Местно-раздражающее действие после введения в носовые ходы не выявлено ни при визуальной оценке, ни при цитогистоархитектоническом анализе.

Многократные инстилляциии вакцины у некоторых животных приводили к покраснению и припухлости носового зеркала, которое исчезало в течение суток, такая же картина была и в контроле. У самцов крыс, получавших 160 мкг, отмечали обратимое увеличение количества тромбоцитов (менее чем в 2 раза) на 43 сутки  $600,4 \pm 67,74 \times 10^9/\text{л}$ , которое снизилось к 58 суткам:  $372,4 \pm 7,55 \times 10^9/\text{л}$ . Остальные показатели клинического анализа крови находились в пределах физиологической нормы и не отличались между группами.

Таким образом, показано, что интраназальная вакцина на основе VLP для профилактики COVID-19 при однократной и многократных инстилляциях в нос не оказывает токсического и местно-раздражающего действия, а также не приводит к интоксикации и гибели лабораторных животных.

## **ВИРУСНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ COVID-19**

*Коробова З.Р.*

*ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия*

С момента своего возникновения новая коронавирусная инфекция COVID-19 стала вызовом для мирового здравоохранения. По мере изменчивости вируса, однако, возникло изменение тяжести и выраженности клинического течения COVID-19. Причиной тому стали не только мутации самого вируса, но и особенности иммунного ответа, в частности, цитокинового профиля.

Материалы и методы: в исследование вошло 289 образцов плазмы крови от пациентов в острой фазе COVID-19. На основании генотипирования вируса и данных об эпидемиологической обстановке в Санкт-Петербурге, пациенты были разделены на четыре группы в зависимости от переносимого ими геноварианта: оригинальный штамм Ухань (n=59), вариант Альфа или B.1.1.7 (n=95), вариант Дельта или B.1.617.2 (n=78), и вариант Омикрон или B.1.1.529 (n=57). В качестве группы контроля использовались образцы, полученные от здоровых доноров (n=51). Методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) в плазме крови определялись концентрации следующих цитокинов/хемокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/ Fractalkine, IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- $\alpha$ , VEGF-A. В качестве описательной характеристики были использованы медиана (далее - Me) и среднее (далее - Mean), верхний и нижний квартили (Q25; Q75), стандартное отклонение ( $\pm$ SD) и стандартная ошибка отклонения ( $\pm$ SEM). После проверки данных на нормальность методом Шапиро-Уилка сравнения между группами проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни для сравнения двух групп, и критерия Краскела-Уоллиса для множественных сравнений. При сравнениях трех и более групп использовался добавочный тест Данна и поправка Бонферонни для исключения эффекта множественных сравнений.

Результаты: в результате проведенного исследования было отмечено, что из пула определяемых цитокинов/хемокинов только семь показали стабильные статистически повышенные значения в сравнении со здоровыми донорами, независимо от геноварианта SARS-CoV-2. Эти цитокины/хемокины включали CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL1/IP-10, IL-6, IL-10, IL-18 и IL-27), а так же наблюдалось снижение одного хемокина, CCL22/MDC. Более подробные данные представлены на рисунке 1.

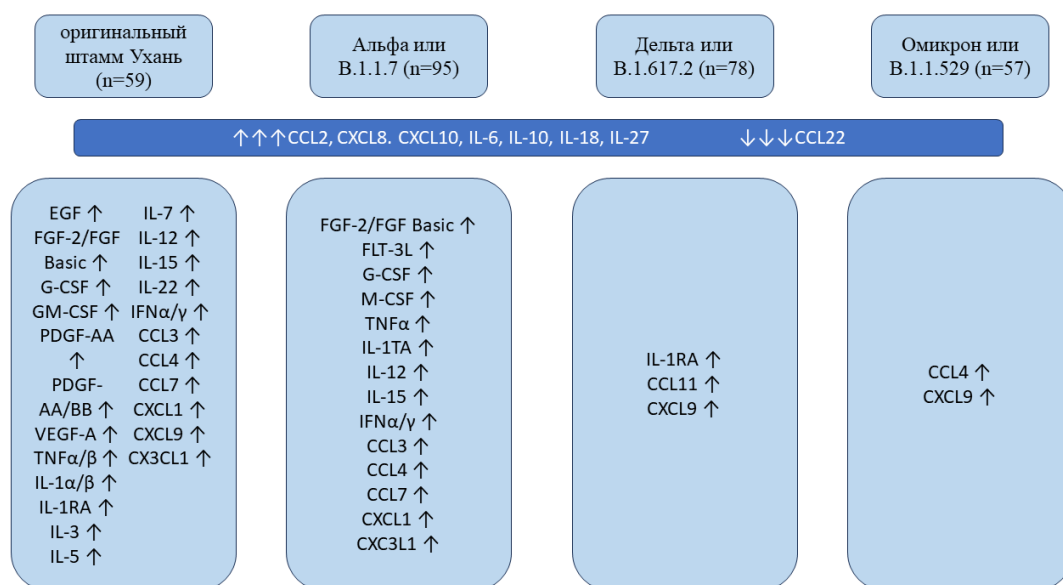


Рисунок 1. Изменения цитокинового профиля в зависимости от геноварианта вируса

Выводы: иммунный ответ, вызываемый разными геновариантами SARS-CoV-2, имеет разную степень выраженности. Геновариант SARS-CoV-2 является значимым фактором, который влияет на тяжесть течения заболевания. По мере эволюции вируса и несмотря на то, что воспалительный профиль COVID-19 изменяется в сторону уменьшения спектра вовлеченных в иммунный ответ цитокинов, существуют «константные» маркеры иммунитета сохранившие свое значение в течение всей пандемии.

## **РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РИНОВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ SMART**

*Ксенафонтов А.Д.<sup>1</sup>, Фадеев А.В.<sup>1</sup>, Гешко С.А.<sup>2</sup>, Коржанова М.<sup>1</sup>, Комиссаров А.Б.<sup>1</sup>,  
Киселёва И.В.<sup>3</sup>, Лиознов Д.А.<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Риновирусы – одни из самых распространённых респираторных вирусов. Они являются одной из главных причин возникновения ОРВИ.

Риновирусы принадлежат к семейству семейству Picornoviridae, роду Enterovirus, и делятся на три вида – А, В и С, на которых приходится 169 типов. Геном риновирусов представлен одноцепочечной (+)РНК длиной 7,2 тыс. нуклеотидов.

В базах данных отсутствуют последовательности полных геномов риновирусов из России. Однако их изучение представляет значительный интерес в связи с их высокой распространённостью и большим вкладом в эпидемиологическую картину.

Наиболее популярным подходом к секвенированию вирусных геномов в настоящее время является ампликонное секвенирование. Однако в связи с высочайшим генетическим разнообразием дизайн праймерных панелей для ампликонного секвенирования риновирусов крайне затруднен. Поэтому для получения последовательностей полных геномов риновирусов было решено воспользоваться технологией SMART, ранее для данного объекта не применявшейся.

Апробацию метода проводили на изоляте риновируса А13 1979 г. из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. В итоге была получена последовательность полного генома со средней глубиной покрытия 478,26. Геном готовится к выгрузке в GenBank. На данный момент это старейшая последовательность генома из всех геномов риновирусов, что депонированы в базы данных.

После успешной апробации на изоляте метод был применён к ПЦР(+) назофарингеальным мазкам от госпитализированных пациентов. В работу было взято 158 образцов, собранных в рамках проекта по госпитальному надзору за гриппом и ОРВИ (GISHN), поступивших в лабораторию с октября 2018 по октябрь 2023 г. из СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина», СПб ГБУЗ «Детская городская

больница Св. Ольги» и СПб ГБУЗ Детская городская клиническая больница №5 им. Н. Ф. Филатова. В качестве критерия отбора использовали значения порогового цикла (Ct) в ПЦР в реальном времени: отбирали образцы с Ct < 26 по данным тестирования с использованием «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), также прошедшие ретестирование с праймерами на область генома риновирусов VP4/VP2, разработанными *da Costa Souza L* (2021) с соавторами, с Ct < 30. РНК была выделена на магнитных частицах NAmagp100 (Биолабмикс, Россия). Обратная транскрипция проводилась набором «RNAscribe RT» (Биолабмикс, Россия). Накопление продукта для секвенирования проводилось при помощи набора «БиоМастер LR HS-ПЦР (Биолабмикс). Для приготовления библиотеки использовалось 35-200 нг амплифицированной ДНК. Библиотеку готовили с помощью набора MGIEasy Fast PCR-Free FS Library Prep Set (MGITech, Китай). Приготовленные библиотеки были пулированы, циркулизованы и секвенированы с целевым покрытием генома 10x при помощи набора для высокопроизводительного секвенирования FCL SE100 на приборе DNBSEQ-G400 (MGITech, Китай). Полученные прочтения были выравнены на референсные последовательности, взятые с базы данных GenBank, сборка и получение консенсусных последовательностей проводились при помощи BWA, Sunturs, Ivar.

Из 158 исследованных образцов было секвенировано 131 геном риновирусов, 18% (n=28) от общего числа имели глубину среднего покрытия больше 15. 17% (n=27) секвенировать не удалось. Достоверно типировано 76% образцов (n=120).

Как уже отмечалось, главной проблемой секвенирования геномов риновирусов является их высокая вариабельность. Зачастую секвенируются участки, которые позволяют определить вид и тип конкретного риновируса, однако получать последовательности полных геномов пока что затруднительно. Использование технологии SMART позволило без дизайна праймерных панелей провести типирование риновирусов в 76% образцов, при этом в 21% случаев удалось собрать почти полные геномы.

Дальнейшее развитие метода SMART-секвенирования позволит проводить геномный надзор за риновирусами человека, что закладывает подход для получения огромного массива генетических данных о циркулирующих риновирусах, который ранее не был доступен.

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОЦЕНКИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПОДАВЛЕНИЯ БЛЯШКООБРАЗОВАНИЯ**

*Кудря К.С., Сергеева М.В.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

*Введение.* Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, началась в конце 2019 года и быстро распространилась по всему миру, а также стала серьезным вызовом для глобального здравоохранения [WHO COVID-19 Situation report, 2020]. Крайне важно следить за иммунным ответом после вакцинации и перенесенной инфекции, чтобы обеспечить эффективное планирование борьбы с эпидемиями в будущем [Mushcab H. et al., 2023]. Важным инструментом для диагностики и мониторинга иммунного ответа после

вакцинации или инфекции является измерение уровней нейтрализующих антител (нАТ), способных связываться с S белком вируса SARS-CoV-2, предотвращая его проникновение в клетку и дальнейшую репликацию. Существует несколько способов измерения уровней нАТ, включая реакцию классической микронейтрализации (PMH), а также реакцию подавления бляшкообразования (РПБО). РПБО имеет ряд преимуществ, включая возможность автоматизированного считывания результатов, более высокую чувствительность и возможность получить результаты в более краткие сроки. Целью данной работы является подбор условий постановки теста подавления бляшкообразования для оценки нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2.

*Материалы и методы.* Для измерения уровня нАТ к вирусу SARS-CoV-2 генетической линии ХВВ.1.5 использовали панель сывороток, полученных от реконвалесцентов сезона 2023-2024 в рамках государственного задания Минздрава России «Долгосрочная оценка коллективного иммунитета и эффективности специфической профилактики населения в условиях динамической циркуляции возбудителей COVID-19 и гриппа в Российской Федерации». Мы использовали клетки Vero E6-TMPRSS2, которые высевали в 96-луночные планшеты с плотностью  $10^6$  кл/пл для PMH и  $2 \cdot 10^6$  кл/пл для РПБО. Сыворотки прогревали в водяной бане 1 час при  $56^\circ\text{C}$ . Делали последовательные двукратные разведения и добавляли разведенный вирус. Для PMH доза вируса составляла 25-100 ТИД<sub>50</sub>/0,05 мл, для РПБО 50-100 бляшек/лунку. Инкубировали сыворотки с вирусом в течение 1 часа при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ , после чего переносили на клетки. В случае PMH клетки инкубировали в течение 96 часов до развития полного ЦПД. В случае РПБО клетки с инокулятом инкубировали 1 час, после чего добавляли покрывающую среду, содержащую двукратную DMEM (Gibco) и 2,4% авицелл (1:1). Далее планшеты инкубировали 15,5 часов, после чего фиксировали клеточный монослой с помощью 80% ацетона и проводили иммуноокрашивание с использованием моноклональных антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 и конъюгата против мышиных IgG, меченного HRP. Далее добавляли субстрат DAB и инкубировали в течение 15 минут до появления фокусов (бляшек), количество которых считали на приборе ImmunoSpot (CTL).

*Полученные результаты.* Оптимизация протокола представляла собой подбор условий для получения четких вирусных бляшек, пригодных для автоматизированного считывания на приборе ImmunoSpot. Для получения ярких и контрастных бляшек мы тестировали различные концентрации конъюгата и субстрат двух производителей (рисунок 1А). Чтобы получить однородные по размеру и форме бляшки, мы варьировали время инкубации (рисунок 1Б), а также проводили эксперименты с удалением и без удаления инокулята. Для сохранения клеточного монослоя в процессе иммуноокрашивания мы изменяли такие параметры, как посевная плотность клеток и способы фиксации клеточного монослоя. Итоговый протокол РПБО для вируса линии ХВВ.1.5 имел следующие параметры: конечная концентрация авицелла в покрывающей среде 1,2%, инкубация клеток с вирусом в течение 15,5 часов, фиксация клеточного монослоя с помощью 80% ацетона в течение 1 часа, конъюгат ab97023 (Abcam), разведенный в 1000 раз, субстрат DAB (Serva).



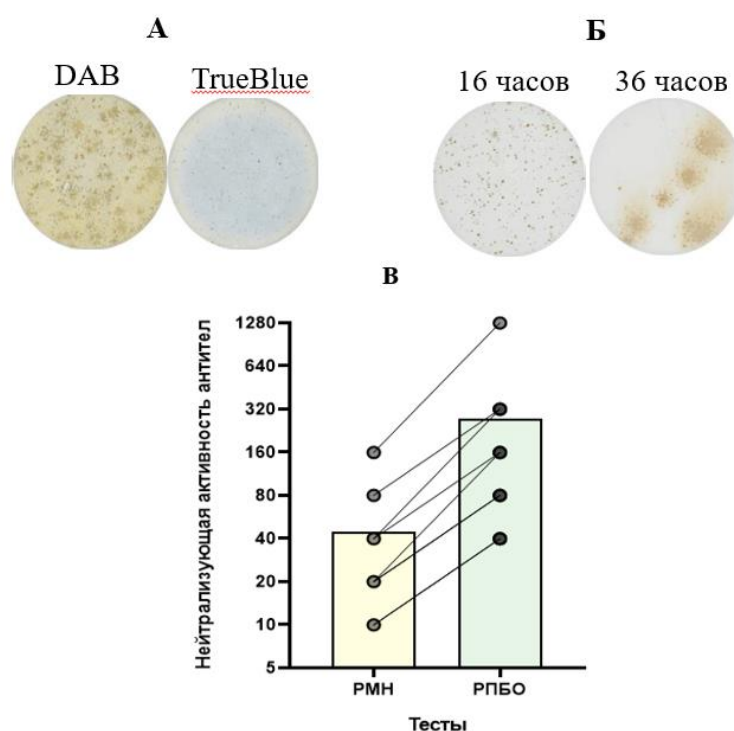


Рисунок 1. Подбор условий для автоматизированного считывания бляшек (А, Б). Сравнение результатов двух тестов для оценки уровня нАТ (В)

Мы сравнили уровни нейтрализующих антител, измеренных с помощью оптимизированного протокола постановки РПБО и классической РМН, к эпидемически актуальному вирусу ХВВ.1.5 в сыворотках реконвалесцентов (n=9) (рисунок 1В). Для всех изученных образцов уровень нейтрализующих антител, измеренный с помощью РПБО, был выше в 4-8 раз, чем уровень нАТ, измеренный с помощью РМН.

Таким образом, в рамках данной работы были подобраны оптимальные условия постановки реакции подавления бляшкообразования, которые позволяют выявлять нейтрализующие антитела в сыворотках реконвалесцентов с более высокой чувствительностью, по сравнению с классической реакцией микронеutralизации.

## ФОРМИРОВАНИЕ АНТИТЕЛЬНОГО И В-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА ПРИ МНОГОКРАТНЫХ ИММУНИЗАЦИЯХ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ У МЫШЕЙ

*Ладыгина М.Д., Романовская-Романько Е.А., Шуклина М.А., Пулькина А.А., Шамакова Д.А., Варюшина Е.А.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Ежегодные вакцинации инактивированными гриппозными вакцинами могут негативно влиять на формирование гуморального и В-клеточного иммунного ответа и приводить к снижению эффективности последующих вакцинаций. Для понимания

механизмов, лежащих в основе этих наблюдений, необходимо проведение экспериментальных исследований различных схем и типов вакцин, включая живые аттенуированные кандидаты с интраназальным способом введения.

Целью исследования являлась разработка методических подходов для изучения формирования антительного и В-клеточного ответа при повторных иммунизациях живым аттенуированным вакцинным штаммом-кандидатом и его инактивированным аналогом у мышей.

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (самки, возраст 6-8 недель). Для иммунизации использовали аттенуированный штамм вируса гриппа A/H1N1/Guandong-Maonan NS124 (Flu/NS124) или его очищенный инактивированный аналог (ИГВ-Н1N1).

В первом эксперименте мышей (n=4 в группе) под легкой эфирной анестезией иммунизировали интраназально Flu/NS124 в дозе 5,0 lgЭИД<sub>50</sub>/мышь 3-х- или 5-кратно с интервалом 3 недели (группы 1 и 2); в группе 3 мыши были иммунизированы 3-х-кратно в дозе 6,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь. ИГВ-Н1N1 вводили внутримышечно 3-кратно в дозах 1,5 мкг и 6 мкг (группы 4 и 5). Контролем служили интактные животные. Длительность наблюдения составила 105 дней.

Во втором эксперименте проводили оценку В-клеточного ответа у мышей (n=5 в группе), иммунизированных Flu/NS124 в дозе 5lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь, 2-х-кратно с интервалом 3 недели (группа 2xFlu/NS124) или 3-кратно с отсроченной третьей иммунизацией на 105-й день (группа 3xFlu/NS124). Длительность наблюдения составила 150 дней.

Уровень антител в сыворотке крови оценивали через 3 недели после каждой иммунизации в реакциях торможения гемагглютинации (РТГА) и микронеutralизации (РМН). Методом проточной цитометрии во втором эксперименте оценивали содержание В-фолликулярных клеток (B220+CD23+IgD+ или IgG+) в плоточных и подмышечных (верхних), а также паховых лимфоузлах на 150-й день эксперимента. В конце каждого эксперимента получали селезенки для гистологического исследования герминативных центров.

Введение Flu/NS124 или ИГВ-Н1N1 во всех исследуемых дозах вызывало индукцию вирус-специфических и нейтрализующих антител в высоких титрах, которые поддерживались повторными иммунизациями. На 105-й день эксперимента у мышей групп 1 и 2 (Flu/NS124, 5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь) СГТ антител не зависел от количества иммунизаций (3 или 5 раз) и составил 1/128 (РТГА), 1/80 (РМН). В группе 3 (Flu/NS124, 6 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь) СГТ антител был равен 1/256 (РТГА), 1/226 (РМН). Максимальные СГТ антител были отмечены в группах 4 и 5, получивших ИГВ-Н1N1 в двух дозах: 1/1024 (РТГА), 1/1140 (РМН) и более.

Во втором эксперименте отмечено формирование максимального уровня СГТ антител после второй вакцинации: 1/256 (РТГА); 1/170 (РМН). После Дня 63 было зафиксировано снижение уровня антител, которые ко Дню 105 составили 1/40 (РТГА), 1/32 (РМН) и сохранялись на данном уровне до конца эксперимента (День 150). В группе мышей, получивших отсроченную третью иммунизацию на 105-й день, наблюдали прирост антител до уровня 1/256 (РТГА), 1/80 (РМН).

При гистологическом исследовании во всех иммунизированных группах наблюдали формирование герминативных центров в селезенках, что свидетельствует о развитии В-клеточного ответа при различных схемах вакцинации. Было показано увеличение содержания В-фолликулярных клеток в верхних лимфоузлах мышей, получивших трехкратную иммунизацию 3xFlu/NS124 по сравнению с группой 2xFlu/NS124 и контролем (рис. 1а). Количество IgD+В-фолликулярных клеток было достоверно выше в обеих иммунизированных

группах (рис. 1б), в то время как содержание IgG<sup>+</sup> В-фолликулярных клеток снижалось при каждой последующей иммунизации (рис. 1в), по сравнению с контролем.

Полученные данные могут служить методической основой для дальнейшего изучения формирования поствакцинального иммунного ответа при многократной иммунизации различными типами противогриппозных вакцин и оптимизации схем вакцинации.

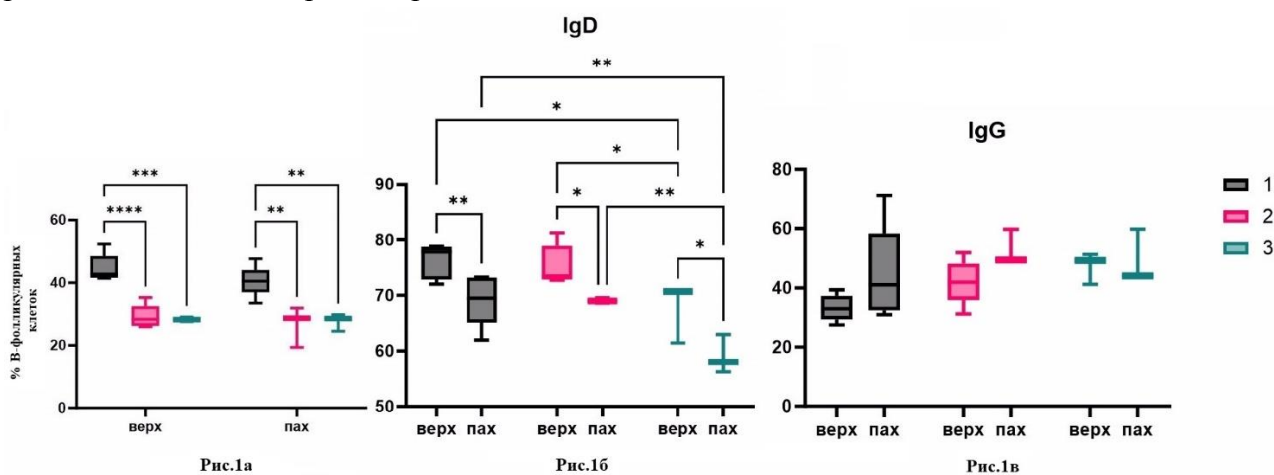


Рис.1а B220+CD23+В-фолликулярные клетки, Рис.1б V<sub>f</sub> – В-фолликулярные клетки, позитивные по IgD, Рис.1в V<sub>f</sub> – В-фолликулярные клетки, позитивные по IgG. % от общего числа B220+лимфоцитов; верх - верхние лимфоузлы, пах – паховые лимфоузлы. Группы: 1- 3xFlu/NS124, 2 - 2xFlu/NS124, 3 – интактные.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА ЧЕЛОВЕКА 1-ГО ТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ, ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Мансур У.<sup>1,2</sup>, Фадеев А.В.<sup>1</sup>, Коржанова М.<sup>1</sup>, Передерий А.А.<sup>1</sup>, Ермилова Е.В.<sup>2</sup>,  
Комиссаров А.Б.<sup>1</sup>, Лиознов Д.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Вирусы парагриппа человека (hPIVs) являются эпидемиологически значимым возбудителем острых респираторных инфекций (ОРВИ). Эти вирусы представляют собой группу сферических, оболочечных, однонитчатых РНК-вирусов, относящихся к семейству *Paramyxovirus* и разделенных на четыре различных серотипа, которые относятся к двум родам *Respirovirus* (hPIV1 и hPIV3) и *Rubulavirus* (hPIV2 и hPIV4). Геном имеет длину около 14,9–17,3 кб и кодирует шесть общих структурных белков в неизменном порядке: 3'-N-P-M-F-HN-L-5'. Основные антигенные детерминанты, ответственные за инфицирование клеток хозяина, представлены гемагглютинин-нейраминидазным (HN) и слияния (F) белками. Они проявляют обширную антигенную изменчивость, что делает их предпочтительными целями

молекулярно-эпидемиологических исследований, тогда как остальные структурные белки оказались антигенно хорошо консервативными.

Геномная характеристика вирусов парагриппа человека первого типа не проводится на территории Российской Федерации. На данный момент нет доступных генетических последовательностей, которые позволили бы провести детальный эпидемиологический анализ циркулирующих штаммов. Целью данной работы является молекулярно-генетическая характеристика вирусов парагриппа человека первого типа циркулирующих в Санкт-Петербурге, методом секвенирования нового поколения.

Исследование проведено на базе лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцев» Минздрава России. Мазки hPIV1 были отобраны из носоглотки от взрослых и детей до 5 лет из Клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина и Городской детской больницы Св. Ольги, г. Санкт-Петербург, Россия, в период с 2018 по 2023 гг. Детекция вируса парагриппа осуществлялась методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию генома hPIV1 проводили с использованием разработанной нами мультиплексной панели праймеров (18 пар праймеров), на основе консенсусной последовательности, полученной в результате множественных выравниваний полных 975 геномов, доступных в базе данных NCBI GenBank. Две отдельные мультиплексные ОТ-ПЦР-реакциях (пулы А и Б) проводили с использованием набора «Биолабмикс БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×)» («Биолабмикс®», Россия) согласно инструкции производителя. Пробоподготовку библиотек для секвенирования осуществляли с использованием набора MGIEasy FAST PCR-FREE FS Library. Полногеномное секвенирование проводили с использованием платформы MGI DNBSEQ G-400 в режиме SE100.

Было получено 34 полных генома hPIV1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей с последовательностями из GenBank проводили с использованием программного обеспечения MAFFT. Сайты N-связанного гликозилирования были предсказаны с использованием сервера NetNGlyc. Филогенетический анализ проводили с помощью программ RAxML и TreeSub с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и визуализированы с помощью программного обеспечения FigTree v1.4.4.

По данным филогенетического анализа циркулирующие вирусы парагриппа человека 1-го типа, циркулировавшие в г. Санкт-Петербурге в 2018-2023 гг., разделяются на две генетические группы (1 и 2). Для данных филогенетических групп были выявлены характерные наборы аминокислотных замен в поверхностных гликопротеинах HN и F. Была показана одновременная циркуляция вирусов, принадлежащих к разным генетическим группам.

В аминокислотной последовательности белка HN выявлено десять потенциальных сайтов N- гликозилирования. Для вирусов hPIV1, принадлежащих к генетической группе 2, показана потеря потенциального сайта гликозилирования в положении 511 белка HN, находящегося вблизи потенциального второго рецептор-связывающего сайта.

# АДАПТАЦИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА ДЛЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА А/Н1N1 К КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK И ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИОННЫХ МУТАЦИЙ В ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНАХ ВИРУСА НА ЕГО БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.*

*ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия*

**Введение.** В настоящее время все живые гриппозные вакцины (ЖГВ) в мире производятся в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Но при наступлении пандемии птичьего гриппа, в особенности в случае высокопатогенного штамма, велика вероятность нарушения работы птицефабрик и нехватки куриных эмбрионов для срочного производства пандемической вакцины. Данная проблема имеет решение при переводе вакцинного производства с РКЭ на перевиваемую культуру клеток млекопитающих, что позволит сделать производство независимым от поставок РКЭ. Однако, смена субстрата для культивирования штаммов ЖГВ, может привести к появлению адаптационных мутаций, влияние которых на различные свойства вакцинных штаммов изучено недостаточно.

**Методы.** В работе был использован штамм для пандемической живой гриппозной вакцины А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (Калиф-17). Адаптацию вакцинного штамма к культуре клеток MDCK проводили при последовательном 5-кратном пассировании, за которым следовало клонирование вируса на культуре клеток методом бляшек. Для получения отдельных клонов из каждой отдельной бляшки на предельных разведениях выделяли вирус, который затем накапливали на культуре клеток MDCK и секвенировали его поверхностные антигены гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) методом Сэнгера. Инфекционные титры вирусов оценивали методом предельных разведений в РКЭ и клетках MDCK и выражали в количестве 50%-х эмбриональных или тканевых цитопатических инфекционных доз (ЭИД<sub>50</sub>/мл, ТЦИД<sub>50</sub>/мл). Для оценки иммуногенности, антигенности и защитной эффективности полученных клонированных вариантов вируса мышей линии BALB/c иммунизировали интраназально двукратно в дозе 10<sup>6</sup> lg ЭИД<sub>50</sub>, с последующим заражением иммунизированных животных летальным вирусом А/Калифорния/07/09-МА (H1N1pdm09).

**Результаты.** Был проанализирован 21 клон адаптированных к клеткам вируса, при этом только у пятнадцати из них были обнаружены мутации в молекуле гемагглютинина, причем только в двух позициях, а аминокислотные последовательности соответствовали одному из следующих штаммов: штамм Калиф17-1 содержал мутацию N156D в HA1, Калиф17-4 – мутацию A44V в HA2 и Калиф17-8 – обе указанные мутации одновременно. Важно отметить, что через два накопительных пассажа штаммы Калиф17-1 и Калиф17-4 стали идентичны штамму Калиф17-8, приобретя дополнительную мутацию. Инфекционные титры вирусов Калиф17, Калиф17-1, Калиф17-4 и Калиф17-8 в РКЭ составляли 8,0; 6,6; 7,1 и 8,2 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, соответственно, тогда как в культуре клеток MDCK эти показатели составили 6,3; 6,2; 7,3 и 7,6 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл, соответственно, что указывает на существенное влияние обнаруженных адаптационных мутаций на репликативную активность вируса H1N1pdm09 в культуре клеток MDCK. Влияние обнаруженных мутаций на кросс-реактивность оценивали в РТГА со всеми исследуемыми вариантами вирусов в качестве

антигенов. Исследование иммуногенности вакцинных вариантов на мышах показало отсутствие разницы в уровнях антител, индуцированными MDCK-адаптированными вакцинными штаммами, по сравнению с классическим штаммом ЖГВ. Результаты данного эксперимента показали отсутствие негативного влияния мутаций N156D и A44V в HA2 на иммуногенность вакцинного штамма ЖГВ H1N1pdm09. Защитная эффективность классического штамма Калиф17 и адаптированного к клеткам варианта Калиф17-8 в эксперименте с заражением иммунизированных и интактных животных летальным для мышей гомологичным вирусом составила 100% для обеих вакцинных групп, тогда как в контрольной группе выживаемость была 0%. Таким образом, адаптационные мутации не повлияли на защитные свойства вакцинного штамма Калиф17.

Выводы. Адаптационные мутации к культуре клеток MDCK в молекуле гемагглютинина вакцинного штамма ЖГВ A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) сохраняют его антигенные и защитные свойства, а также увеличивают репликативные свойства в культуре клеток MDCK. Таким образом, вакцинные штаммы, подготовленные на субстрате РКЭ, можно использовать для производства культуральной ЖГВ с сохранением эффективности вакцины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту FGWG-2022-0001.

## **ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХИМЕРНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА M12B9CH К БЕЛКУ M1 ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ**

*Никитин В.Н., Меркульева Ю.А., Сергеев А.А., Щербаков Д.Н.*

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия*

За последние 40 лет было получено более двадцати моноклональных антител (мкАт), которые показали свою эффективность в лечении острой ортопоксвирусной инфекции у животных и обладающих терапевтическим потенциалом для человека. Наиболее перспективными являются широконейтрализующие мкАт, способные препятствовать проникновению вируса в клетки. Известно, что основными белками-мишенями нейтрализующих антител являются белки комплекса слияния-проникновения (ЕFC), среди них выделяется белок M1 вируса натуральной оспы (и его ортологи), белок имеет высокую степень гомологии между патогенными для человека ортопоксвирусами, и содержит иммунодоминантные эпитопы, что позволяет обнаруживать множество нейтрализующих антител с перекрёстной реактивностью. Примером такого антитела является мышинное моноклональное антитело M12B9 против вируса осповакцины, однако для улучшения его терапевтического потенциала необходима гуманизация, характеристика и исследование вируснейтрализующих свойств в отношении широко спектра ортопоксвирусов.

Целью данной работы является получение химерного варианта мышиногo антитела M12B9ch, нацеленного на белок M1 ВНО, изучение его иммунохимических свойств и нейтрализующей активности в отношении патогенных для человека ортопоксвирусов.

Аминокислотные последовательности, кодирующие переменные домены тяжелой и легкой цепей мышиного IgG2a M12B9, извлекали из базы данных NCBI Protein Database (ID: 4U6H\_A, 4U6H\_B). Проектировали полипептид, содержащий последовательно лидерный пептид V19 (MMRPVIVLVLLFATS), VH-домен, GS-линкер (4xGGGGS) и VL-домен M12B9, и проводили оптимизацию кодонного состава с помощью Codon Optimization Tool (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>) для экспрессии в клетках золотистого хомячка (клеточная линия CHO-K1).

Итоговую последовательность синтезировали и клонировали в интегративном плазмидном векторе pVEAL (RU2749459C1), использующем систему «Sleeping Beauty», в рамке считывания с шарнирной областью, CH2 и CH3 доменами человеческого IgG1 для получения химерного антитела в формате scFv-Fc. Конструкция получила название pVEAL-M12B9ch и была использована для разработки стабильной культуры-продуцента на основе клеток CHO-K1. Клетки продуцента культивировали в бутылках на роллерной установке в режиме периодической замены питательной среды. Очистку антител из культуральной среды проводили с помощью аффинной хроматографии на белке А, затем переводили препарат антитела в PBS, с помощью диализа.

Специфичность препарата антитела M12B9ch подтверждали в ИФА с использованием лизата вируса осповакцины штамм ЛИВП в качестве иммуносорбента.

Затем исследовали взаимодействие M12B9ch с белком M1 вируса натуральной оспы. Для этого получали рекомбинантный внеклеточный домен белка M1 (а.о. 5-185) в клетках CHO-K1. Антитело M12B9ch взаимодействовало с рекомбинантным белком M1 в ИФА с пикомолярным средством.

Анализ нейтрализующей активности M12B9ch в отношении вирусов осповакцины и натуральной оспы определяли в реакции ингибирования бляшкообразования на культуре клеток VERO *in vitro*. Антитело нейтрализовало вирус осповакцины в концентрации ~ 0,065 мкг/мл и вирус натуральной оспы в концентрации ~ 0,053 мкг/мл в отсутствие компонентов системы комплемента.

Таким образом полученное в данной работе химерное scFv-Fc антитело M12B9ch, обладающее сродством к вирусному белку L1 вируса осповакцины и его ортологу – белку M1 вируса натуральной оспы, нейтрализует оба вируса *in vitro* и является кандидатом для разработки препаратов на основе широконейтрализующих моноклональных антител против патогенных для человека ортопоксвирусов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ГЗ-41/21 «Разработка рекомбинантных широконейтрализующих антител против патогенных для человека ортопоксвирусов».

# ИЗУЧЕНИЕ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРОТОТИПА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ СО ВСТРОЕННОЙ АНТИГЕННЫЙ САЙТ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ M2E

*Новицкая В.В., Меркурьев А.В., Меженская Д.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

*ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия*

Существование антигенного дрейфа и шифта, приводящих к изменению поверхностных гликопротеидов вируса гриппа, обуславливает потребность в ежегодном обновлении состава гриппозных вакцин согласно рекомендациям ВОЗ. Несоответствие антигенного состава лицензированных вакцин циркулирующим подтипам приводит к их низкой эффективности и, как следствие, тяжёлым осложнениям и высокому уровню госпитализации среди лиц с ослабленным иммунитетом. Одной из стратегий создания универсальной гриппозной вакцины является включение в её состав консервативных эпитопов вирусных белков, что позволило бы сформировать кросс-реактивный иммунный ответ и обеспечить перекрёстную защиту в отношении широкого спектра штаммов вируса гриппа.

В данной работе консенсусная последовательность фрагмента эктодомена белка M2 (M2e<sub>7-16</sub>) вируса гриппа А была встроена в антигенный сайт S<sub>b</sub> глобулярного домена гемагглютинаина (НА) штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1). С использованием методов обратной генетики был получен реассортантный штамм (PR8+M2e), который содержал гены внутренних и неструктурных белков от донора аттенуации живой гриппозной вакцины (ЖГВ) А/Ленинград/134/57, описанный выше химерный ген НА+M2e, а также интактный ген нейраминидазы (NA) от штамма PR8. Полученный рекомбинантный штамм был способен реплицироваться в развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK, а также характеризовался холодоадаптированным и температурочувствительным фенотипом, присущим классическим вариантам штаммов ЖГВ.

Оценку способности химерного вируса экспрессировать дополнительные фрагменты M2e проводили путем заражения культуры клеток MDCK с последующим выявлением целевого белка с использованием моноклональных антител 14C2. При этом в качестве контрольного вируса был использован реассортантный штамм с интактными генами НА и NA от вируса PR8. Был установлен статистически достоверно более высокий уровень детекции M2e-антигена в клетках, заражённых химерным штаммом, по сравнению с контрольным вариантом, что указывает на вклад встроенного эпитопа M2e в молекуле НА в присутствие данного белка на поверхности инфицированных клеток.

В ходе сравнительного изучения иммуногенности вакцинного штамма PR8+M2e и варианта без модификации НА на мышинной модели было показано, что внесение дополнительного эпитопа M2e в головную субъединицу НА не снижает уровень гуморального иммунного ответа к цельному вирусу, при этом обеспечивая увеличение уровня IgG антител к консервативному антигену M2e.

Для изучения способности рекомбинантного штамма PR8+M2e ЖГВ обеспечивать перекрёстную защиту в отношении антигенно-удалённых вирусов гриппа А иммунизированных мышей подвергали челлендж-инфекции штаммами



А/Калифорния/7/2009 (H1N1) и А/Филиппины/2/82 (H3N2). После интраназального заражения данными вирусами группы животных, иммунизированных PR8+M2e, продемонстрировали 100% и 80% уровень выживаемости, соответственно, и наименьшее снижение массы тела в сравнении с контрольными группами PR8 и PBS.

Исследование эффективности перекрёстной защиты, обеспечиваемой гуморальным иммунным ответом без учёта вклада Т-клеточного звена, было проведено в ходе ретроорбитального введения мышам иммунных сывороток с последующим заражением челлендж-вирусами. Выживаемость группы, которой пассивно переносились сыворотки мышей, двукратно иммунизированных PR8+4M2e, после челленджа вирусами А/Калифорния/7/2009 (H1N1) и А/Филиппины/2/82 (H3N2) составила 40% и 20%, соответственно. При этом уровень смертности животных в группах сравнения PR8 и PBS достиг 100%.

Стоит отметить, что эффективность пассивной иммунизации в отношении гетерологичных вирусов H3N2 и H1N1 с использованием сывороток мышей, привитых вирусом с одним фрагментом M2e в антигенном сайте глобулярного домена HA, оказалась ниже, чем в экспериментах по изучению пассивной защиты вакцинными штаммами, несущими четыре тандемных повтора M2e с N-конца молекулы HA, возможно, ввиду более высокой копийности M2e антигена в составе каждого вириона химерного штамма ЖГВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту FGWG-2022-0001.

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПЦР ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5 МЫШИ**

*Олейник В.А.<sup>1,2</sup>, Ёлишин Н.Д.<sup>2</sup>, Плотникова М.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Толл-подобные рецепторы (TLR) — основные молекулы врождённого иммунного ответа млекопитающих, также регулирующие корректную работу адаптивных реакций иммунитета и участвующие в патогенезе аутоиммунных заболеваний. У мышей имеется 13 видов TLR, а у людей — 10, каждый из которых активируется конкретным типом патоген-ассоциированных молекулярных паттернов. На внутренней поверхности эндосом и лизосом расположены TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, распознающие нуклеиновые кислоты, попадающие внутрь гранулы (двучпочечные и однопочечные РНК, метилированные ДНК и CpG-олигодезоксинуклеотиды). Наряду с трансмембранными эндолизосомальными рецепторами, в клеточной цитоплазме функционируют такие сенсоры вирусной репликации, как RIG-I и MDA5, индуцирующие выработку интерферонов I типа в ответ на распознавание вирусной РНК (дцРНК, а рецептором RIG-I выступает также и оцРНК, несущая 5'-трифосфатную группу). TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, а также цитозольные сенсоры RIG-I и MDA5, запускают каскад первичных реакций, обеспечивающих развитие воспалительной

реакции и реализацию защитных функций врождённого иммунитета в ответ на внедрение чужеродных (в том числе вирусных) РНК и ДНК.

Цель. Основной целью нашей работы было создание ПЦР тест-системы, позволяющей оценивать экспрессию эндолизосомальных TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, а также сенсоров RIG-I и MDA5, в тканях и органах мыши.

Методы. Для дизайна праймеров и олигонуклеотидных зондов был использован онлайн инструмент PrimerQuest Tool (IDT). Последовательности олигонуклеотидов подбирались таким образом, чтобы детектировать все транскрипционные варианты гена, предпочтительная теоретическая температура отжига для праймеров находилась в диапазоне 55–57°C, для зондов — 63°C. Наряду с генами интереса были подобраны праймеры и олигонуклеотидные зонды для референс-генов, используемых для нормировки. Согласно литературным данным, в качестве нормировочных генов были выбраны Rplp0 и Hpvt1 (для оценки относительной экспрессии в ткани лёгких), ген Ubc (для использования в качестве референс-гена при оценке экспрессии в лейкоцитах крови), а также традиционно используемый ген GAPDH. Длина всех амплифицируемых продуктов при проведении ПЦР с подобранными праймерами находится в пределах 86–117 нуклеотидов. Дизайн эксперимента предполагает использование шести наборов мультиплексных ПЦР, в каждой из которых происходит амплификация одного из генов интереса и референс-гена.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия).

Результаты. На первом этапе были получены положительные плазмидные образцы (ППО) для оптимизации условий ПЦР. Для этого методом обратной транскрипции с последующей ПЦР были получены фрагменты заявленных генов. Длины соответствующих фрагментов были подтверждены методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, выделены, очищены, лигированы по выступающим олиго-A-концам в вектор pAL2-T и трансфицированы в бактериальный штамм E. coli DH5α. Концентрации полученных девяти ППО находились в диапазоне 70–585 нг/мкл.

Полученные ППО далее использовали для подбора оптимальных условий ПЦР и расчёта эффективностей ПЦР. После анализа температур отжига праймеров в диапазоне от 57°C до 67°C и оптимизации временного профиля ПЦР был предложен следующий профиль с 2-ступенчатым циклом: 95°C — 5 мин, далее 40 циклов: 95°C — 10 с, 60°C — 30 с.

Далее при подобранных оптимальных условиях были рассчитаны эффективности ( $1-10^{-1/\text{slope}}$ ) проведения ПЦР в мультиплексном и моноплексном форматах.

Таким образом, была разработана тест-система для относительной количественной оценки экспрессии мРНК TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I и MDA5 в тканях и органах мыши с нормировкой по референс-генам Rplp0, Hpvt1, Ubc и GAPDH, которая удовлетворяет всем необходимым требованиям для проведения анализа уровней экспрессии с использованием ΔΔCt метода. Далее разработанная ПЦР тест-система будет использована для анализа экспрессии мРНК при проведении экспериментов по оценке эффективности противовирусных препаратов на модели гриппозной инфекции у мышей.

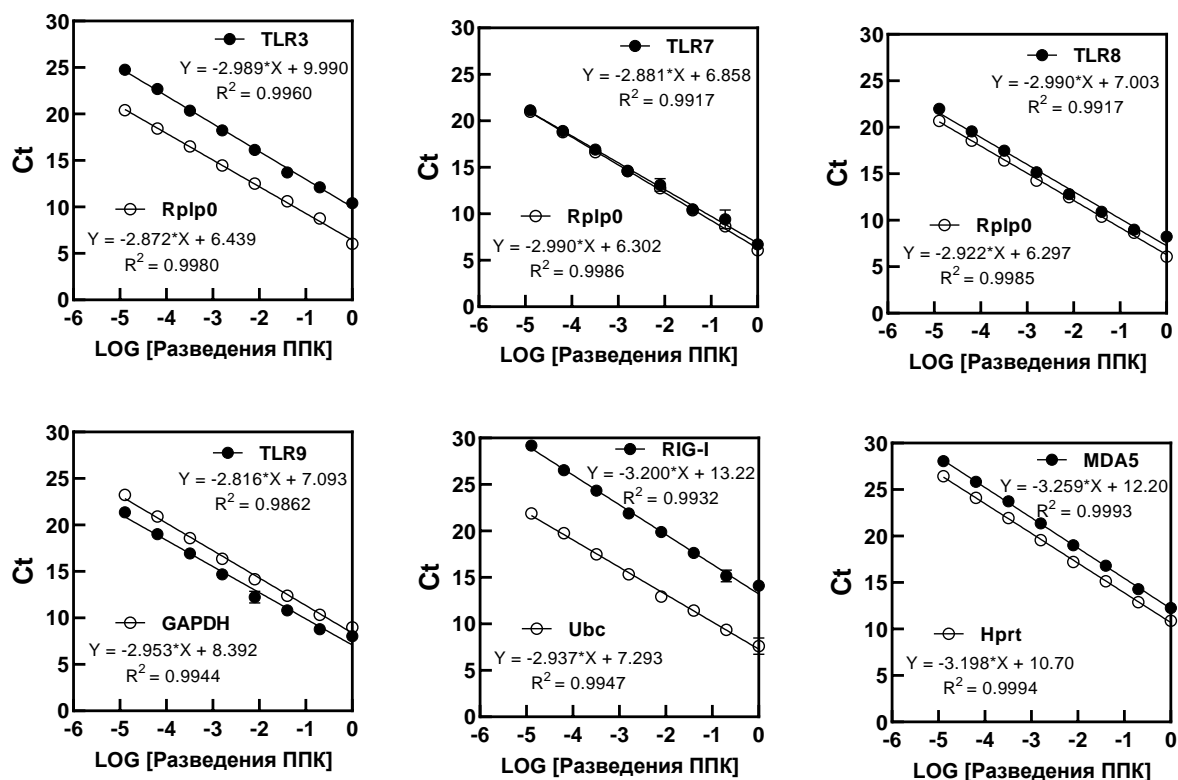


Рисунок 1. Расчёт эффективностей амплификации фрагментов TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I и MDA5 в мультиплексных ПЦР с соответствующими нормировочными генами

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗАННЫХ С SARS-COV-2 КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУТЕЙ У ЛЮДЕЙ С ДЕМЕНЦИЕЙ

*Передерий А.А., Айвазян И.С., Коноплёва С.А., Комиссаров А.Б.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Нейродегенеративные заболевания (НЗ) поражают миллионы людей во всем мире. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространённой причиной деменции. Болезнь Альцгеймера — это наиболее распространённое возрастное НЗ, на борьбу с которым нацелено большое количество научных и клинических усилий. Было проведено довольно обширное количество исследований для изучения биологических процессов, лежащих в основе данного заболевания, несмотря на данный факт, всё ещё существует значительная потребность в понимании уже известных и до сих пор не известных молекулярных механизмов, лежащих в основе БА.

С другой стороны, накапливающиеся многочисленные эпидемиологические и клинические исследования также показывают, что инфекция SARS-CoV-2, начавшаяся в 2019 году, и «длительный COVID» в определённой степени связаны с нейродегенеративными расстройствами, неврологическими реакциями на стресс, а также нейропластичностью головного мозга. Очевидно, что НЗ распространены особенно у

пожилых пациентов с SARS-CoV-2, а также у пациентов, страдающих интеркуррентными или сопутствующими заболеваниями (болезни сердца, диабет, гипертония, нервно-психические и другие возрастные расстройства). Потенциальное влияние SARS-CoV-2 на развитие и прогрессирование НЗ вызывает растущую обеспокоенность и научный интерес.

Предполагается, что вирусные инфекции, в том числе SARS-CoV-2, являются факторами, способствующими нейродегенерации, вызывающими хроническое воспаление, окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию и агрегацию белков. Однако существует значительная потребность в понимании до сих пор неизвестных молекулярных механизмов, лежащих в основе НЗ при SARS-CoV-2.

В работе были проанализированы данные транскриптомных исследований образцов, полученных в ходе аутопсии фронтальной коры у людей с БА GSE164332, GSE202182 и GSE231409. Для квантификации ридов использовалась программа kallisto; для анализа путей (анализа обогащения набора генов) использовался пакет GAGE; для анализа коэкспрессии генов использовался пакет WGCNA.

С помощью WGCNA было получено 3 кластера коэкспрессирующихся генов: 1 кластер (MEsaddlebrown) имеет положительную корреляцию с SARS-CoV-2 равную 0.63 и  $p < 0.01$ , 2 кластера имеют отрицательную корреляцию с деменцией: 1 кластер (MEthistle2) с корреляцией -0.64 и  $p < 0.01$  и 2 кластер (MEyellow) с корреляцией -0.51 и  $p < 0.05$ .

Мы проанализировали MEsaddlebrown с помощью Cytoscape, а также нашли хабовые гены с помощью инструмента Cytohubba и алгоритма MCC (Рисунок 1). Все эти гены являются важными элементами, регулирующими как процессы ядрышкового стресса, трансляции вирусных белков и подавления экспрессии белков хозяина, такие белки называют РНК-связывающими белками (РСБ) (*RPL3*, *RPL8*, *RPL27A*, *RPL13*, *RPL36*, *RPL13*, *RPL36*), так и процессы, участвующие в динамике РНК при НЗ (*EIF3A*, *ABCF1*, *NCL*) и в митохондриальной дисфункции (*PINK1*, *FIS1*, *TOMM7*, *MFN2*, *OPTN*, *SLC25A6*).

В результате работы мы выявили потенциальную связь SARS-CoV-2 при НЗ, которая связана с процессами как динамики РНК, посредством РСБ, которые, как известно, являются основными регуляторами генов на РНК уровне, так и митохондриальной дисфункции. РСБ могут агрегировать с образованием РНК гранул, так называемых стрессовых гранул (СГ). Накопление СГ внутри клеток может приводить к образованию токсичных агрегатов и, таким образом, способствовать патологии ряда нейродегенеративных заболеваний, включая деменцию. В свою очередь хрупкий баланс между делением и слиянием митохондрий имеет решающее значение для функции нейронов, а нарушения этого баланса способствуют патогенезу различных нейродегенеративных заболеваний.

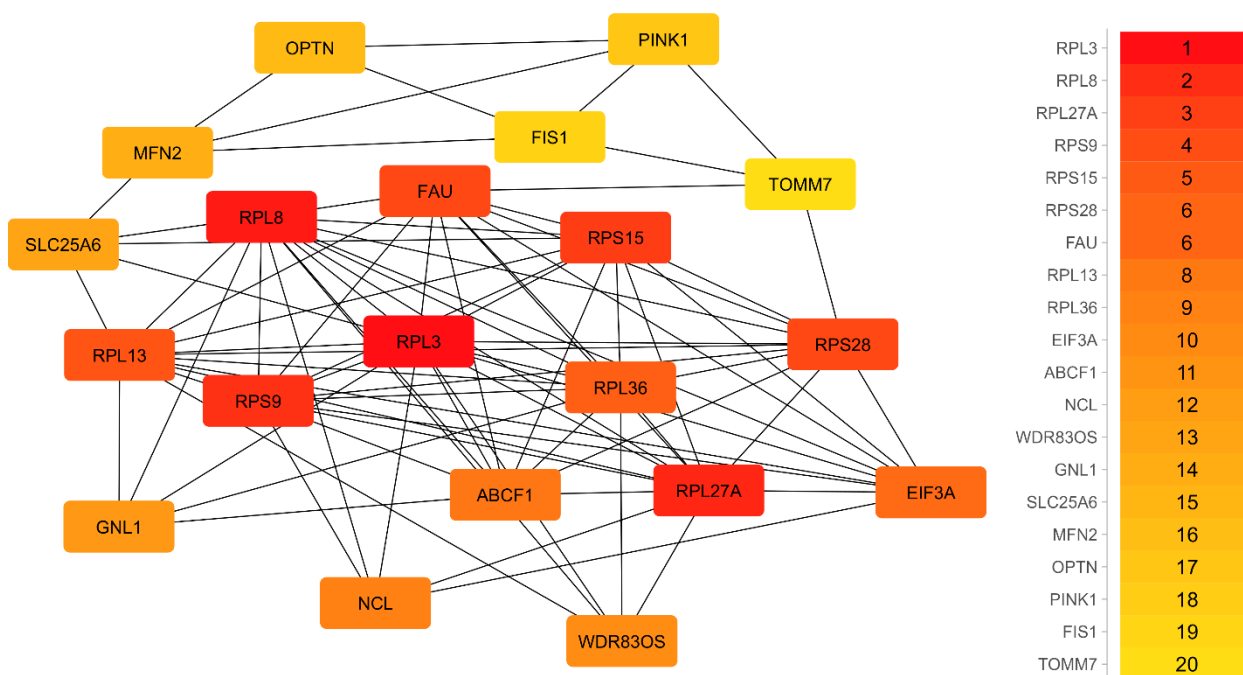


Рисунок 1. Топ 20 проаннотированных хабовых генов в модуле MEsaddlebrow

## РОЛЬ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В РАЗВИТИИ ТЯЖЕЛЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ. ВЛИЯНИЕ ПАНДЕМИИ SARS-CoV-2

*Петрова Е.Р.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является одним из наиболее важных патогенов, вызывающих тяжелые формы респираторных инфекций (ТОРИ) с поражением нижних отделов дыхательного тракта, чаще всего у детей первых двух лет жизни. Кроме того, установлено, что РСВ инфекция (РСВИ) представляет опасность и для пациентов пожилого возраста, а также для больных с иммунодепрессивными состояниями. Развитие пандемии SARS-CoV-2 повлияло на частоту регистрации РСВ по данным традиционного эпидемиологического надзора, однако, мало что известно о развитии ТОРИ, требующих госпитализации, вызванных РСВ.

Цель исследования: провести возрастных особенностей этиологии ТОРИ и анализ значимости РСВ на разных стадиях эпидемического процесса с оценкой влияния на этот процесс пандемии SARS-CoV-2.

В ходе исследования проанализированы результаты детекции РСВ в 7321 клинических образцах от детей в возрасте от 0 до двух лет, 3418 образцах от детей 3-6 лет, 2880 образцах детей в возрасте 7-17 лет, а также в 3645 образцах от взрослых 18-64 лет и 1194 образцов от пожилых людей в возрасте 65 лет и старше.

По результатам исследований оказалось, что в предпандемический период РСВИ относилась к числу наиболее значимых инфекций для детей младшего возраста (0-2 лет),

частота регистрации которой в сезоны 2018-2019 и 2019-2020 при ТОРИ не уступала гриппу и составляла 25,7% и 26,8% от числа обследованных в этой возрастной группе. С увеличением возраста частота ее регистрации у госпитализированных детей достоверно снижалась до 13,6 – 16,5% в группе 3-6 лет и 3,3-4,8% у школьников 7-17 лет ( $p < 0,05$ ). Частота регистрации РСВИ у взрослых 18-64 лет при ТОРИ была невелика (1,0-2,2%), на порядок ниже, чем у детей, но становилась в 1,9 раза выше у пожилых больных. В разгар пандемии (2020-2021гг.) РСВИ, как и грипп, стала регистрироваться среди детей с ТОРИ редко, вне зависимости от возраста, и совсем не обнаруживалась среди взрослых, хотя другие инфекции, такие как риновирусная, метапневмовирусная и парагриппозная, диагностировались достаточно часто. Интересно, что по данным госпитального надзора за все 5 лет наблюдения в возрастной группе детей до 6 лет, частота обнаружения РСВ всегда превышала частоту регистрации SARS-CoV-2.

В последующие два сезона РСВ вновь вернулся в циркуляцию с возрастающей частотой детекции у больных ТОРИ от сезона к сезону, так что в последнем сезоне (2022-2023 гг.) она достигла 24,1% у детей младшего возраста и 12,1% у дошкольников 3-6 лет. При этом возрастная тенденция к преимущественному поражению детей младшего возраста сохранилась в полной мере ( $p < 0,05$ ). В сезоны 2021-2022 и 2022-2023 частота детекции РСВ у детей в возрасте 0-2 лет приблизилась к предпандемическим показателям и стала достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем частота выявления вирусов гриппа, хотя в более старших детских возрастных группах дошкольного и школьного возраста ситуация менялась в обратную сторону за счет снижения роли РСВ и повышения частоты детекции вирусов гриппа ( $p < 0,05$ ).

Мониторинг частоты детекции РСВ за последние пять лет показал значимость РСВИ в структуре респираторных заболеваний.

## **АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2023-2024 ГГ.**

***Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Васильева А.Д., Шелепанова Т.Н.,  
Большакова М.В., Коновалова Н.И.***

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, России*

Вирусы гриппа А(Н3N2) циркулируют среди людей уже более 50 лет, продолжая вызывать ежегодные эпидемии. Основным механизмом эволюции данных вирусов является антигенный дрейф, который основан на точечных изменениях аминокислот, находящихся в поверхностных белках – гемагглютинине и нейраминидазе. С момента своего появления в 1968 году вирусы гриппа А(Н3N2) претерпели существенные генетические и антигенные изменения. Результатом постоянной и достаточно быстрой эволюции вирусов гриппа стало ежегодное появление штаммов с обновленными характеристиками, что привело к многочисленным сезонным эпидемиям. При таком высоком уровне изменчивости вирусов гриппа, имеющиеся вакцины не обеспечивают долговременной протекции, и их состав

ежегодно пересматривается экспертами Глобальной сети эпидемиологического надзора за гриппом ВОЗ (GISRS). Для вирусов гриппа А(Н3N2) за весь период наблюдения ВОЗ дала рекомендации об обновлении вакцинного штамма 28 раз. Таким образом, по сравнению с другими подтипами вирусов гриппа, вирусы А(Н3N2) характеризуются более высокой скоростью эволюции и более частой сменой доминирующего антигенного варианта.

Вирусы гриппа А(Н3N2) являлись доминирующим этиологическим агентом в эпидемиологический сезон 2023-2024 гг. Для проведения антигенного анализа, циркулирующих вирусов гриппа был использован метод РТГА. В РТГА с использованием крысиных и хорьковых поликлональных постинфекционных антисывороток было проанализировано 440 вирусов гриппа, среди них 437 штаммов А(Н3N2), два штамма линии В Виктория и один вирус А(Н1N1)pdm09. Вирусы А(Н3N2) тестировались в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата с 0,75% эритроцитами морской свинки.

Большинство тестируемых изолятов (56,3%) взаимодействовали с хорьковой антисывороткой к вакцинному штамму А/Дарвин/06/21 и А/Дарвин/9/21 до 1-1/4 гомологичного титра. Однако 43,7% штаммов распознавались этими сыворотками хуже - в пределах 1/8-1/16 гомологичного титра, что свидетельствует о продолжающемся антигенном дрейфе и наличии изменений в антигенных сайтах молекулы НА. Был проведен анализ взаимодействия, циркулирующих вирусов с крысиной антисывороткой к вакцинному штамму 2024-2025 гг. для Северного Полушария А/Тайланд/08/22. Установлено, что все проанализированные изоляты нейтрализовались сывороткой до 1-1/4 гомологичного титра.

Значения титров антител при взаимодействии антисывороток референс-штаммов предыдущих лет А/Гонконг/2671/19 (Egg) и А/Камбоджа/e0826360/20 (Egg) не превышали 1/32-1/64 гомологичного титра. В отличие от вирусов предыдущего эпидемиологического сезона, изоляты 2023-2024 гг. нейтрализовались антисывороткой к референс-штамму А/Бангладеш/4005/20 (Siat) до 1/4-1/16 гомологичного титра.

Антигенное картирование демонстрирует нарастание антигенной дистанции, циркулирующих вирусов гриппа А(Н3N2) от вакцинных штаммов для Северного Полушария на 2023-2024 гг. А/Дарвин/06/21 и А/Дарвин/09/21. Вирусы текущего сезона расположены на расстоянии 2-4 квадратов от вакцинных штаммов, что в среднем на один-два квадрата дальше, чем демонстрировали вирусы 2022-2023 гг. выделения.

Таким образом, антигенный анализ показал частичное соответствие, выделенных в России вирусов гриппа А(Н3N2) вирусам-кандидатам в противогриппозные вакцины на 2023-2024 гг.

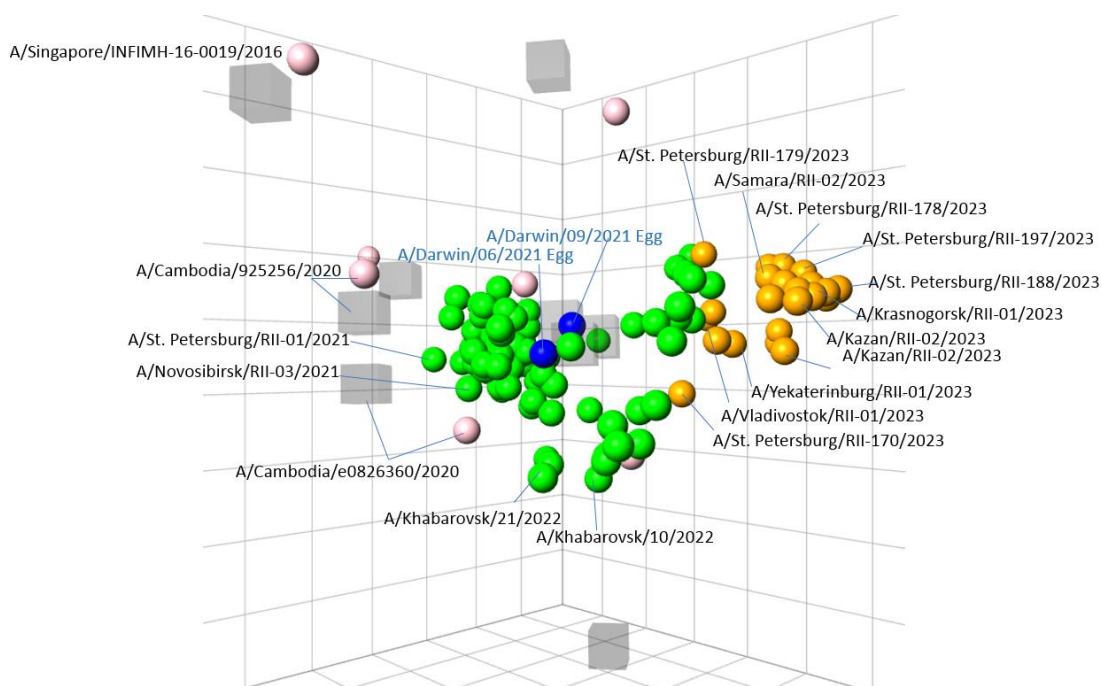


Рисунок 1. Антигенная карта вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных на территории России в эпидемическом сезоне 2023-2024 гг.

Розовые кружки – эталонные антигены; синие кружки – рекомендованные ВОЗ вакцинные штаммы на сезон 2023-2024 гг. для Северного полушария; оранжевые кружки – российские изоляты текущего сезона; зеленые кружки – российские изоляты предыдущих сезонов; серые квадраты – постинфекционные крысиные антисыворотки.

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ TBEV ANALYZER®

*Платова С.Е., Форгани М.*

<sup>1</sup>ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ/ТБЕВ) — переносимый в основном иксодовыми клещами возбудитель тяжелого природно-очагового инфекционного заболевания, широко распространенного по всей Евразии. ВКЭ принадлежит к роду *Flavivirus* из семейства *Flaviviridae*. Его геном представлен цепью +РНК длиной примерно 11 тыс. оснований, кодирующей полипротеин, который на посттранскрипционном этапе делится на ряд структурных и неструктурных белков. Среди структурных белков гликопротеин Е является поверхностным белком, взаимодействующим с рецепторами организма-хозяина, и его нуклеотидная последовательность служит хорошим объектом для филогенетических



исследований ВКЭ. Филогенетический анализ позволяет выделить четыре основных подтипа вируса: TBEV-Eu (Европейский), TBEV-FE (Дальневосточный), TBEV-Sib (Сибирский) и TBEV-Bkl (Байкальский), а также несколько филогенетических линий внутри Сибирского подтипа.

Мониторинг ВКЭ включает регулярный сбор, регистрацию, хранение и анализ новых последовательностей. Один из инструментов изучения популяционной структуры ВКЭ является кластерный подход. С целью автоматизации и сохранения воспроизводимости данного подхода был разработан TBEV Analyzer<sup>®</sup> — платформа для быстрого анализа ВКЭ, с целью определения принадлежности штамма к подтипу, филогенетической линии и кластеру. Кластер — это группа штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями фрагмента гликопротеина Е, как правило, филогеографически близких и имеющих определенный тип территориального распространения. Алгоритм кластерного анализа включает два этапа: 1) определение филогенетической линии и подтипа исследуемого штамма; 2) поиск соответствия между аминокислотной последовательностью штамма и кластерами, принадлежащими к определённым ранее филогенетической линии и подтипу. Если совпадение есть, штамму будет отнесен к соответствующему кластеру, в противном случае платформа определяет штамм как уникальный.

В данной работе для анализа распространения и эволюции ВКЭ, а также оценки работоспособности платформы TBEV Analyzer<sup>®</sup>, был проведён анализ 3361 последовательности вируса, опубликованных в базе данных GenBank. 1319 объекта, содержащие неполные последовательности фрагмента гена Е, были исключены из анализа. Остальные последовательности были проанализированы с помощью TBEV Analyzer - 1653 из них принадлежали различным кластерам, а 389 были определены как уникальные (Рисунок 1). На следующем этапе, используя определённые до уровня кластеров последовательности, был рассчитан аппроксимированный эволюционный возраст кластеров (Рисунок 1). Возраст рассчитывали на основе метрики p-distance между последовательностями внутри кластера и ранее определенной скорости нуклеотидных замен, равной  $1,56 \pm 0,29 \times 10^{-4}$  синонимических замен на сайт в год.

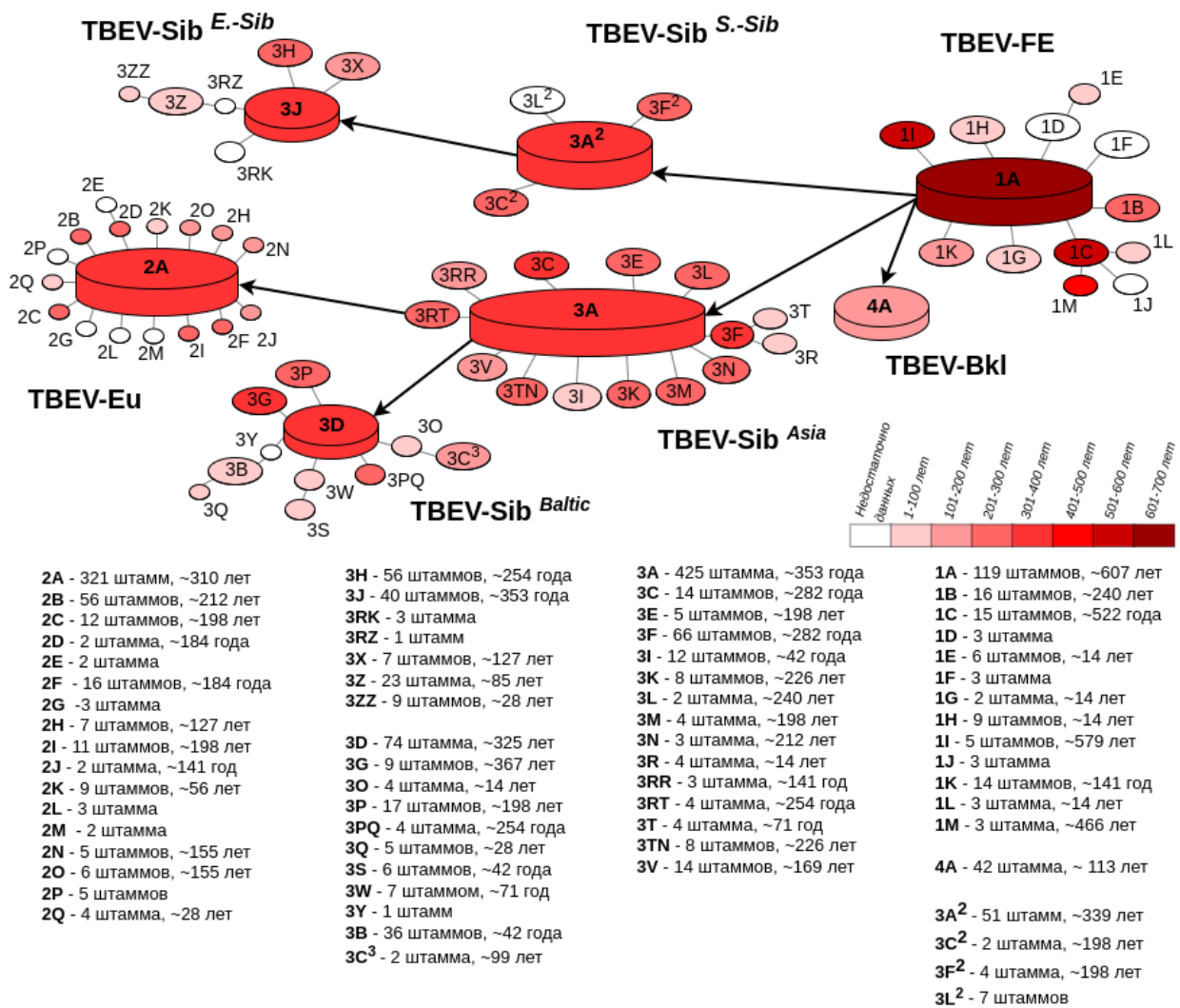


Рисунок 1. Структура кластеронов ВКЭ с приведённой информацией о количестве штаммов в кластеронах и их приблизительном эволюционном возрасте

Результаты показывают, что платформа способна точно охарактеризовать филогенетическое положение большинства исследуемых штаммов, определяя их место в кластеронной структуре, что имеет важное значение для изучения филодинамики вируса в глобальном и локальном масштабе, мониторинга распространения вируса, а также оценки его патогенности. Идентифицированные таким образом штаммы позволяют делать предположения об эволюции отдельных групп вируса. Оценка возраста кластеронов согласуется с разработанной ранее кластеронной структурой ВКЭ. Таким образом, производные кластероны являются эволюционно более молодыми, чем кластероны-основатели. Кроме того, информация об уникальных штаммах, полученная в ходе анализа, может иметь важное значение для оценки появления и формирования новых филогенетических линий и даже подтипов.

## УСИЛЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПУТЕМ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА

*Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Рак А.Я., Матюшенко В.А., Новицкая В.В.,  
Костромитина А.Д., Чистякова А.К., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

*ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия*

*Введение.* Помимо создания и разработки новых вакцин против вируса гриппа, не менее важной задачей является усовершенствование уже существующих лицензированных и применяемых в практике здравоохранения. В частности, одним из способов расширения спектра защитного потенциала живой гриппозной вакцины (ЖГВ) является оптимизация поствакцинального репертуара Т-клеток. Улучшить кросс-протективные свойства ЖГВ можно путем внесения в состав генома вакцинного штамма нуклеопротеина (NP) от эпидемического родительского вируса. Такая стратегия подразумевает под собой замену классической формулы генома вакцинного штамма с 6:2 на 5:3. *Основной целью* данного исследования является детальная оценка субпопуляций вирусспецифических системных и тканерезидентных Т-клеток памяти ( $T_{RM}$ ) у мышей, иммунизированных штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 с формулами генома 6:2 и 5:3.

*Материалы и методы:* с использованием методов обратной генетики были сконструированы два экспериментальных вакцинных штамма ЖГВ подтипа H1N1, отличающихся источником гена NP – у штамма ЖГВ 6:2 ген нуклеопротеина (NP) унаследован от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [Лен/17], а у штамма ЖГВ 5:3 NP от эпидемического вируса А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1) [H1N1/wt]. Самок мышей линии C57BL/6J иммунизировали интраназально вакцинными штаммами, двукратно с интервалом в 3 недели. Через 7 дней после второй иммунизации выделяли клетки из тканей селезенки и легких мышей. Далее выделенные клетки стимулировали очищенным на градиенте плотности сахарозы цельным диким вирусом гриппа H1N1/wt и оценивали уровни цитокин-продуцирующих Т-клеток памяти с фенотипом CD44+CD62L-методом проточной цитометрии. Для клеток, выделенных из легочных тканей, дополнительно определяли экспрессию поверхностных маркеров CD69 и CD103. Гуморальный иммунитет к вирусу H1N1 оценивали в иммуноферментном анализе путем определения уровней IgG в сыворотках крови мышей, собранных через 3 недели после повторной иммунизации.

*Результаты:* Накопленные в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) вирусы обладали высокой инфекционной активностью: штамм ЖГВ 6:2 реплицировался в РКЭ при 33°C до титра 9,5 IgЭИД<sub>50</sub>/мл, а штамм ЖГВ 5:3 – до 8,9 IgЭИД<sub>50</sub>/мл. Эти данные указывают на то, что включение NP от эпидемического родителя не несет негативного влияния на репликативные свойства вакцинного штамма ЖГВ. Вакцинный штамм ЖГВ 5:3 индуцировал достоверно более выраженный гуморальный иммунный ответ к актуальному вирусу гриппа, чем классический 6:2 вариант ЖГВ. Эти данные могут указывать на то, что при иммунизации ЖГВ антитела формируются не только к поверхностным антигенам вируса гриппа – гемагглютинуину и нейраминидазе, но и к его нуклеопротеину.

В группе мышей, вакцинированных ЖГВ 5:3, наблюдались более высокие уровни вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток эффекторной памяти (T<sub>EM</sub>) в селезенках мышей, включая субпопуляцию полифункциональных (IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ +IL-2+) CD4+ T<sub>EM</sub>, по сравнению с группой ЖГВ 6:2. Также наблюдалась тенденция к выработке более высоких уровней тканерезидентных вирусспецифических Т-клеток памяти (T<sub>RM</sub>) в тканях легких при иммунизации ЖГВ 5:3 в сравнении с ЖГВ 6:2, однако достоверных отличий в стимуляции T<sub>RM</sub> с фенотипами CD69+CD103- и CD69+CD103+ между экспериментальными группами не наблюдалось.

*Заключение:* В данном исследовании были получены дополнительные экспериментальные свидетельства перспективности модификации формулы генома вакцинного штамма сезонной живой гриппозной вакцины с 6:2 на 5:3 с целью актуализации эпитопного состава вакцинных вирусов, поскольку такая модификация усиливает вирусспецифический Т-клеточный иммунный ответ как на системном уровне (в селезенках), так и на локальном уровне (в тканях легких), что в итоге может повысить эффективность вакцины в отношении циркулирующих вирусов гриппа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту FGWG-2022-0001.

## **ВЛИЯНИЕ МЕДЛЕННЫХ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ГРИППА НА ЕГО АНТИГЕННОСТЬ И КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ**

*Рак А.Я., Забродская Я.А., Прокопенко П.И., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Случаи гриппозной инфекции, вызванной новыми штаммами высоко вариабельного вируса, ежегодно выявляются во всем мире и наносят существенный ущерб мировой экономике и социальной сфере. Для предотвращения распространения инфекции в условиях постоянного появления новых штаммов возбудителя целесообразно использовать кросс-протективные вакцины и универсальные диагностические тест-системы на основе одного из наиболее консервативных антигенов вируса гриппа – нуклеопротеина (NP). Однако NP компонент вируса гриппа также подвержен эволюционным изменениям, и мало что известно о влиянии медленно появляющихся адаптивных мутаций на его антигенность и иммуногенность.

В данной работе нами были получены рекомбинантные NP антигены трех эволюционно удаленных штаммов вируса гриппа А: А/New York/61/15 (H1N1), лицензированного донора для живой гриппозной вакцины А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Brisbane/34/18 (H3N2). Для экспрессии белков были использованы клетки *E.Coli* BL21(DE3), трансформированные экспрессионным вектором pETDuet-1, содержащим соответствующие полноразмерные гены. После подбора оптимальных условий индукцию белкового синтеза проводили с использованием изопропил- $\beta$ -D-тиогаляктозида (IPTG), а затем рекомбинантные антигены очищали из лизированных ультразвуком биомасс методом

иммобилизованной металл-аффинной хроматографии (IMAC). Полученные белки были идентифицированы масс-спектрометрическим и серологическим методом. Рекомбинантные NP использовали в качестве антигенов для внутрибрюшинной иммунизации мышей линии BALB/c (20 мкг/животное трехкратно с интервалом 14 дней) и как покрывающие антигены ИФА в концентрации 2 мкг/мл с целью изучения влияния мутаций, возникающих в результате эволюции вируса гриппа, на изменение антигенных и иммуногенных свойств NP. Образцы крови собирали спустя 14 дней после 3-й иммунизации.

В результате выполнения исследования нами выявлена значительная перекрестная реактивность мышинных анти-NP антител, образующихся в ответ на иммунизацию рекомбинантными NP трех эволюционно удаленных вариантов вируса гриппа А. В то же время оказалось, что наибольшей иммуногенностью обладает NP штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Рисунок 1, А), а антитела, образующиеся в ответ на иммунизацию этим вариантом NP, в меньшей степени способны к распознаванию NP штаммов вируса гриппа А, циркулировавших в 2015 и 2018 годах (Рисунок 1, В). Эти данные свидетельствуют о медленном накоплении адаптивных мутаций в NP в процессе эволюции вируса и хорошо согласуются с результатами, полученными нами ранее методом иммуоэпитопного анализа NP *in silico*, по которым большинство экспериментальных или предсказанных иммуногенных CD8<sup>+</sup>-эпитопов NP белка вирусов-вакцинных доноров 1930-1960х годов выделения не является консервативным, то есть не встречается в последовательностях NP циркулирующих вирусов гриппа, что обуславливает необходимость актуализации NP в составе гриппозных вакцин.

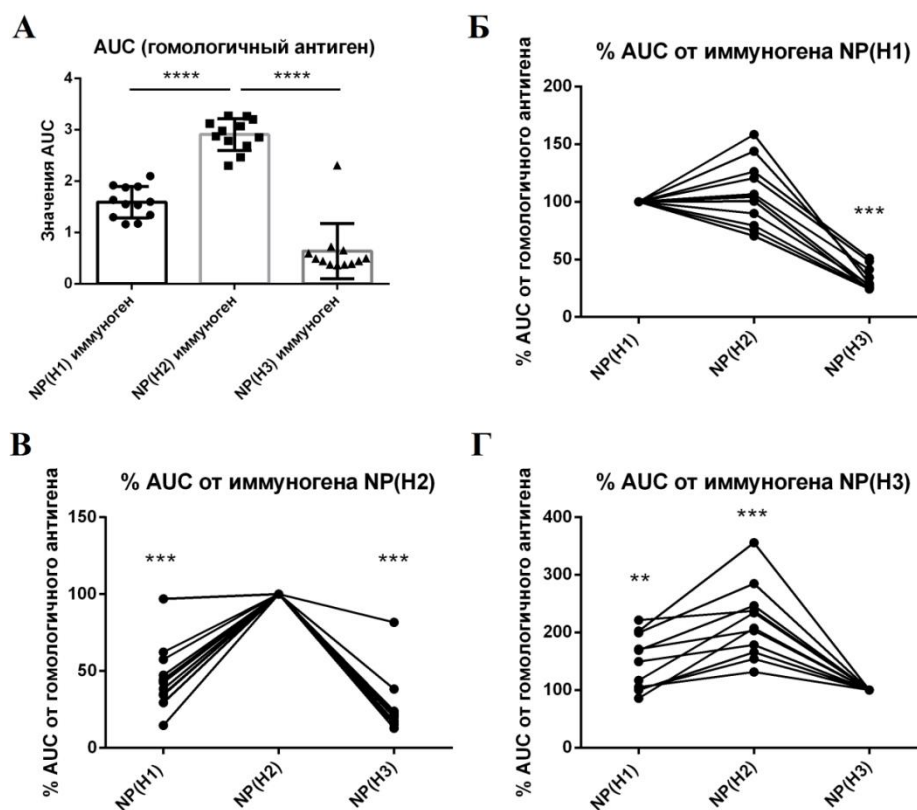


Рисунок 1. Иммуногенность рекомбинантных NP (А) и относительная специфичность антител против NP штаммов H1N1 (Б), H2N2 (В), H3N2 (Г) по отношению к гомологичным и гетерологичным антигенам. AUC – площадь под кривой OD<sub>450</sub>, \*\*\*\* - p<0,0001, \*\*\* - p<0,001, \*\* - p<0,01

Таким образом, полученные нами результаты отражают медленный характер эволюции NP, что влияет на спектр специфичности анти-NP антител и должно учитываться как ограничение при разработке кросс-протективных вакцин и тест-систем на основе NP антигена.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №21-75-30003.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНЫХ КОИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ *M. PNEUMONIAE* В РОССИИ В ПЕРИОД ОКТАБРЬ 2023 – ФЕВРАЛЬ 2024**

*Рог И.С., Чудинов И.К., Корнеев Е.В., Лукина-Гронская А.В., Матюшкина Д.С.,  
Белелятдинова И.Х., Сперанская А.С.*

*НИИ Системной биологии и медицины, Москва, Россия*

Вспышки микоплазменных инфекций возникают каждые 3-7 лет по всему миру. Микоплазменная инфекция редко вызывает тяжелые симптомы, но у ряда пациентов, чаще у детей, развивается пневмония. Заболеваемость *M. pneumoniae* поднимается в осенне-зимний период, одновременно с респираторными вирусами, однако исследований их взаимодействия мало. В статье 2023 года авторы из Китая утверждали, что более тяжелое течение наблюдается при сочетании микоплазменной инфекции с аденовирусной. Мы предположили, что у российских пациентов в 2023 развитие пневмонии также могло быть связано с присоединением респираторных вирусов.

Методом ПЦР в реальном времени мы проанализировали на наличие респираторных вирусов (аденовирус, риновирус, бокавирус, метапневмовирус, SARS-CoV-2, бетакоронавирус HKU1, бетакоронавирус OC43, альфакоронавирус 229E, альфакоронавирус NL63, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), парагрипп, грипп) 193 образца от детей, госпитализированных с диагнозом J15.7 Пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*, поставленным на основании клинико-рентгенологической картины пневмонии и положительного результата ПЦР-теста на *M. pneumoniae*. Клинический материал представлял собой назофарингеальные мазки или мокроту. Даты забора биоматериала – с 19.10.2023 по 21.02.2024. В качестве контроля мы использовали две группы: контрольная группа 1 состояла из 38 детей, не имеющих симптомов ОРЗ либо имеющих легкие симптомы, не требующие госпитализации, материал был собран с 21.12.2023 по 30.01.2024; контрольная группа 2 состоит из 72 взрослых, не имеющих симптомов ОРЗ либо имеющих легкие симптомы, не требующие госпитализации, материал был собран 20.12.2023.

По результатам нашего исследования в опытной группе было выявлено 119 (62%) пациентов с вирусной коинфекцией, среди них аденовирус (n=8), риновирус (n=8), бокавирус (n=2), метапневмовирус (n=1), SARS-CoV-2 (n=24), бетакоронавирус HKU1 (n=5), бетакоронавирус OC43 (n=3), альфакоронавирус 229E (n=3), альфакоронавирус NL63 (n=4), РСВ, тип А (n=2), РСВ, тип В (n=6), парагрипп, тип 1 (n=4), парагрипп, тип 2 (n=2),

парагрипп, тип 3 (n=35), парагрипп, тип 4 (n=51). У 90 пациентов был один коинфектант, у 24 – два, у 3 – три, у 1 – четыре, у 1 – семь.

В контрольной группе 1 (здоровые дети) было выявлено 8 (21%) детей с вирусными инфекциями, среди них риновирус (n=1), SARS-CoV-2 (n=6), бетакоронавирус HKU1 (n=1), бетакоронавирус OC43 (n=1), альфакоронавирус NL63 (n=5), РСВ, тип А (n=1), парагрипп, тип 4 (n=1). У 4 детей был один патоген, у 2 – два, у 1 – три, у 1 – пять. У четверых была выявлена *M. pneumoniae*.

В контрольной группе 2 (здоровые взрослые) было выявлено 39 (54%) случаев вирусных инфекций, среди них риновирус (n=6), бокавирус (n=1), метапневмовирус (n=5), альфакоронавирус NL63 (n=1), РСВ, тип А (n=1), парагрипп, тип 1 (n=5), парагрипп, тип 2 (n=1), парагрипп, тип 3 (n=23), парагрипп, тип 4 (n=5). У 31 испытуемого был один возбудитель, у 7 – два, у 1 – три. У троих была обнаружена *M. pneumoniae*.

35 образцов были проанализированы на наличие генов устойчивости к антибиотикам, значимых мутаций обнаружено не было.

Образцы подходящего качества были посеяны на питательную среду, для трёх образцов было выполнено полногеномное секвенирование на платформе Oxford Nanopore Technologies, ближайший штамм *M. pneumoniae* – M129. Обработка полученных данных продолжается.

Результаты демонстрируют различия в количестве и структуре вирусных патогенов между опытной и контрольными группами, что позволяет предположить влияние вирусов на тяжесть течения микоплазменной инфекции. В дальнейшем мы планируем продолжить исследование мутаций генов антибиотикорезистентности и проанализировать клинические данные, что позволит сделать более обоснованными выводы о возможных причинах тяжелого протекания заболеваний, вызванных *M. pneumoniae*.

Работа выполнена на базе НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора в рамках государственного задания «Разработка алгоритмов для выявления новых, уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипическая характеристика *in vitro*», номер 12203090069-4.

## **ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА РСВ**

***Романовская-Романько Е.А., Пулькина А.А., Сагитдинова К.А.***

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Большинство серологических и иммунологических методов исследований предусматривают применение иммунных сывороток животных. На показатели иммунного ответа могут существенно влиять такие факторы как физико-химическое состояние антигена, доза, способ, интервалы и кратность введения антигена, применение адъювантов и иммуномодуляторов.

Целью исследования было определение оптимальной схемы введения антигена РСВ лабораторным мышам для получения специфических сывороток с наиболее высоким титром нейтрализующих антител.

В данной работе мышам линии BALB/c трехкратно с интервалом в 2 недели вводили антиген РСВ различными способами. Группы 1 и 2 были иммунизированы внутримышечно очищенным формалин-инактивированным РСВ (ИФ-РСВ) в концентрации 5 и 40 мкг/животное с добавлением в качестве адъюванта 20 мг гидроксида алюминия Al(OH). Группа 3 получала интраназально штамм РСВ A2 в дозе 5,9 log БОЕ/животное. Животным в группе 4 вводили очищенный РСВ с полным и неполным адъювантами Фрейнда (225 мкг/животное, 4,2 log БОЕ/животное). Через 2 недели после каждого введения антигена у мышей были получены образцы сывороток, в которых было проанализировано наличие РСВ специфических антител IgG методом ИФА и определен уровень нейтрализующих антител в отношении респираторно-синцитиального вируса A2 методом РМН в культуре клеток Нер-2. Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2016 и GraphPad Prism v9.5.1.

В результате проведенных исследований было показано, что использованные в работе способы введения антигена позволяют сформировать детектируемый уровень РСВ-специфичных IgG после трехкратного введения. Однако интраназальный способ доставки оказался оптимальным для формирования как сывороточных антител класса IgG, так и нейтрализующих РСВ-специфических антител. Статистически значимые различия в уровне IgG, специфичных к РСВ, для этой группы мышей были обнаружены уже после однократного введения антигена (рисунок 1А). Также было отмечено, что интраназальное введение мышам РСВ штамма A2 эффективнее стимулировало формирование нейтрализующих антител (рисунок 1Б). Трехкратное введение живого РСВ приводило к статистически значимо более высокому уровню антител, подавляющих репликацию вируса, достигавшему титра 1:1280.

При проведении статистического анализа было показано значимое увеличение антител класса IgG после третьей иммунизации в сыворотках мышей, иммунизированных 40 мкг ИФ-РСВ и очищенным РСВ с адъювантами Фрейнда (ANOVA, критерий Тьюки,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , соответственно). В сыворотках мышей, получавших антиген интраназально, статистически значимый прирост как РСВ-специфичных IgG, так и нейтрализующих антител был обнаружен и после второй, и после третьей иммунизации (ANOVA, критерий Тьюки,  $p < 0,0001$ ).

На примере прототипа ИФ-РСВ было показано, что увеличение дозы вводимого антигена РСВ приводит к формированию более высокого титра нейтрализующих антител, а также специфичных к РСВ антител класса IgG.

Было установлено, что интраназальное введение РСВ антигена, имитирующее естественную инфекцию, приводит к формированию более высокого уровня нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей по сравнению с другими способами введения. При этом каждое последующее введение РСВ антигена интраназально приводило к достоверному увеличению титров нейтрализующих антител.



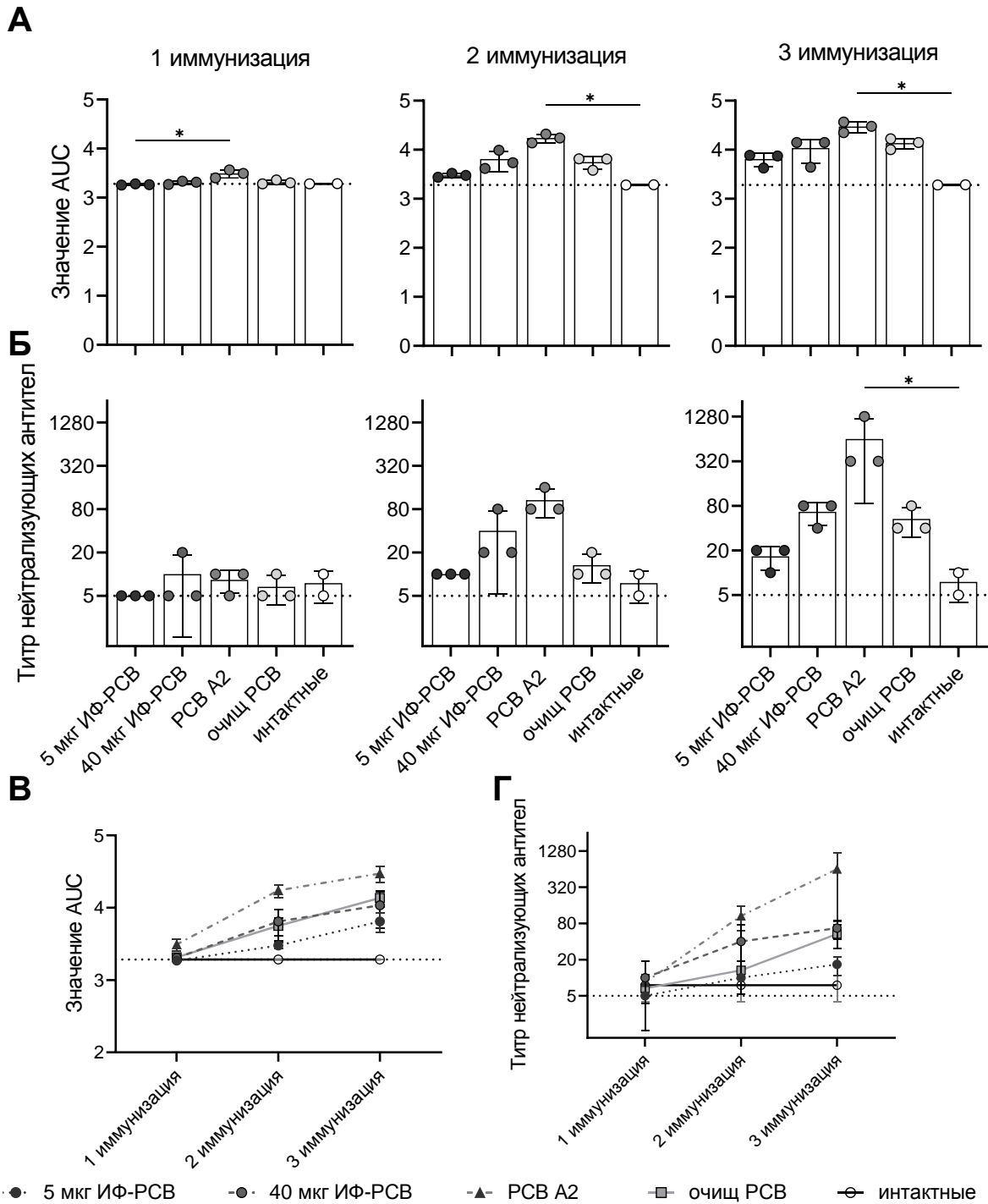


Рисунок 1. Динамика уровня РСВ-специфических антител класса IgG (А, В) и нейтрализующих антител (Б, Г) в сыворотке мышей, получавших антигены РСВ А2 в схеме трехкратного введения. AUC – площадь под кривой OD<sub>(450-620)</sub>, \*\*\*\* - p<0,0001, \*\*\* - p<0,001, \*\* - p<0,01, \* - p<0,05. (тест Краскела-Уоллиса, критерий Данна)

## ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИОЦИНОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*

*Рябинин Г.В.*

*Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

Эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением респираторных вирусных инфекций, остается напряженной во всем мире. На современном этапе новое направление в лечении и профилактике вирусных инфекций связано с использованием штаммов пробиотических бактерий рода *Lactobacillus*. Так в исследованиях, проведенных в Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной в 2021 году, доказано, что пробиотические бактерии способны оказывать противовирусное действие. Все исследуемые пробиотические штаммы рода *Lactobacillus* обладали рядом свойств, которые обеспечивали противовирусный эффект. Перспективным в этом отношении был признан российский промышленный штамм *Lactobacillus plantarum* 8 RA-3, входящий в состав препарата Лактобактерин, поскольку он являлся наиболее метаболически активным, способным синтезировать бактериоцин плантарицин. Супернатант бактериальной культуры *L. plantarum* 8 RA-3 проявлял активность в отношении высокопатогенного штамма гриппа A/Animal Guly/Saratov/1676/2018 (H5N6) при разведении до 12,5% от исходной концентрации. Следовательно, активные экзометаболиты, продуцируемые пробиотическими микроорганизмами, в т.ч. бактериоцины, подавляют размножение респираторных вирусов в культуре клеток.

С помощью разработанной нами в 2017 году инновационной биотехнологии получения белковых антимикробных экзометаболитов был выделен бактериоцин плантарицин из супернатанта штамма *L. plantarum* 8 RA-3, входящего в состав препарата Лактобактерин (НПО «Биомед», Россия). Нами установлено, что антибактериальное действие выделенного бактериоцина по отношению к индикаторной культуре *Escherichia coli* ATCC 10798 сопоставимо с действием ампициллина в концентрации 10 мг/л.

В дальнейшем планируется провести тестирование активности выделенного антимикробного пептида в отношении вирусов гриппа А. Полученные результаты помогут раскрыть потенциал бактериоцинов пробиотических бактерий рода *Lactobacillus* для терапии респираторных вирусных инфекций.

## **ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ СОБАК Г. АЛМАТЫ В 2023-2024 ГГ.**

*Сактаганов Н.Т., Баймухаметова А.М., Байсейит С.Б., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Кливлеева Н.Г.*

*Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан*

Введение Инфекционные респираторные заболевания собак — распространенный во всем мире синдром заболевания многофакторной этиологии. В последнее время в развитие данного синдрома вовлечены новые патогены, среди которых вирус гриппа А (ВГА) и респираторный коронавирус. Чтобы лучше понять роль различных патогенов в развитии респираторного синдрома и их эпидемиологическую значимость необходимо расширение базы данных о распространенности данных возбудителей. Вирусы гриппа в частности являются широко распространенными во всем мире возбудителями, инфицирующими обширный круг хозяев, из-за чего его зоонозный потенциал представляет серьезную угрозу для здоровья людей. Есть ряд публикаций о передаче вирусов гриппа собакам от хозяев. В то же время собаки благодаря ежедневному выгулу взаимодействуют не только с человеком, но и широким кругом своих сородичей и дикими и синантропными животными, поэтому высока вероятность того, что собаки могут выступать посредниками для межвидовой трансмиссии вирусов. Показано, что в организме собак могут экспрессироваться вирусы гриппа как птичьего, так и человеческого типа, что не исключает вероятности появления в их среде новых реассортантных вариантов.

Цель работы. Выявление возбудителей респираторных вирусных инфекций, циркулирующих среди собак г. Алматы в 2023-2024 гг.

Материалы и методы. Носоглоточные смывы от собак собирали в стерильные пробирки, содержащие 2 мл транспортной среды. Выделение РНК/ДНК из исследуемых образцов и реакцию обратной транскрипции проводили с использованием наборов «Рибо-Преп», «Реверта-L» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Генетический материал респираторных вирусов выявляли в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией на приборе Rotor-Gene Q6plex (QIAGEN, Германия) с наборами реагентов: «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL» и «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» – того же производителя.

Удаление неспецифических ингибиторов в сыворотках крови осуществляли с помощью Receptor Destroying Enzyme II (DENKA SEIKEN), с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин. Уровень специфических антител к гемагглютинином вирусом гриппа в сыворотках крови определяли в РТГА с наборами производства ООО "Предприятие по производству диагностических препаратов" (Санкт-Петербург, Россия), в соответствии с рекомендациями производителя. Постановку ИФА осуществляли согласно инструкции с использованием тест-систем с нуклеопротеин-специфическими моноклональными антителами к ВГА (IDEXX Influenza A, США).

Результаты и обсуждение. Для изучения циркуляции респираторных инфекции в популяции собак г. Алматы в эпидемический сезон 2023-2024 гг. собрали 355 ротоглоточных смывов и 180 сывороток крови. Смывы были исследованы на наличие вирусов –

возбудителей респираторных инфекций. В результате ОТ-ПЦР генетического материала ВГА обнаружен в 32 пробах (9,01% от общего числа исследованных проб), из которых в 19 (5,35%) обнаружена РНК ВГА H1N1pdm. Генетический материал ВГА H3N2, коронавируса, бокавируса, аденовируса в исследованных образцах не выявлен.

Результаты РТГА показали наличие антигемагглютининов к вирусу сероподтипа A/H1N1pdm в 6,11% случаев (11 проб) от общего числа образцов, к A/H3N2 – 9,44% (17 проб), к ВГА H5, H7 и типа В антител не выявлено. Титры антител составили в 1:40–1:160. В ИФА установлено наличие антител к нуклеопротеину ВГА в 5,56% (10 проб).

Таким образом, результаты скрининга биологических проб в ОТ-ПЦР, РТГА и ИФА выявили наличие у собак вирусов гриппа типа А.

Вывод. Таким образом, полученные результаты подтверждают факт инфицирования собак вирусами гриппа типа А. Необходимо продолжить исследования циркулирующих в популяции собак респираторных вирусов для получения более полной картины внутривидовой передачи инфекции, межвидовой трансмиссии, а также возможных случаев реассортации штаммов в их организме.

## **ВКЛАД ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА PNEUMOVIRIDAE В СТРУКТУРУ ОРВИ У ДЕТЕЙ В Г. НОВОСИБИРСКЕ В 2020 – 2024 ГГ.**

*Сароян Т.А., Нохова А.Р., Басова П.С., Гутова Т.А., Шестопалов А.М.,  
Шариов К.А., Курская О.Г.*

*«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,  
Новосибирск, России*

Актуальность. ОРВИ занимают ведущее место в инфекционной патологии из-за высокой контагиозности и быстрого распространения респираторных вирусов. Наиболее восприимчивой популяцией является детское население. После вспышки SARS-CoV-2, вызвавшей пандемию COVID-19, различные исследования показали, что эпидемиологические и клинические особенности инфекций, вызываемых респираторными вирусами, изменились.

Цель. Оценка этиологии вирусов вызывающих ОРВИ, во время эпидемических сезонов 2020 – 2024 гг. у детей в г. Новосибирске.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования был использован клинический материал (мазки из носа и зева) от 4630 пациентов, поступивших в детские стационары г. Новосибирска. Исследование образцов на наличие генетического материала вирусов, вызывающих ОРВИ (респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) и метапневмовирусы (МПВ) человека, вирусы гриппа А и В, риновирус, вирусы парагриппа, коронавирусы человека (OC43, 229E, NL63, HKU1), аденовирус, бокавирус, SARS-Cov-2) осуществляли с помощью ПЦР в режиме реального времени коммерческими наборами «АмплиСенс».

Результаты и их обсуждение. Исследовано и проанализировано 4630 клинических образцов, собранных в период с ноября 2020 г. по март 2024 г. у детей в возрасте от 0 до 17 лет. Наибольшее количество образцов (56,2%) получили от детей раннего возраста (0-2 года), 27,3%

образцов – от детей в возрасте 3-6 лет; 16,5% образцов – от детей 7-17 лет. В сезон 2020-2021 гг. было собрано 1130 образцов. В результате анализа образцов вирусов гриппа не было обнаружено. Ведущим этиологическим агентом явился МПВ (43,8%). Следующими по частоте детекции были сезонные коронавирусы (OC43, 229E, NL63, HKU1) – в 20,6%, вирусы парагриппа (15,3%) и риновирус (13,1%). Аденовирус был выявлен в 4,4%, бокавирус – в 2,6%, РСВ – в 0,2% случаев. В сезоне 2021-2022 гг. мы вновь наблюдали заболевания, вызванные вирусом гриппа (у 10,9% пациентов). При этом был выявлен только вирус гриппа А(Н3N2). РСВ был выявлен у 20,3% обследованных детей. Риновирус детектировали у 10,4% детей. Новый коронавирус SARS-CoV2 был выявлен в 14,1% случаев. Остальные респираторные вирусы были обнаружены менее чем в 5% случаев. Следует отметить, что в течение всего сезона 2021-2022 гг. нами не было выявлено ни одного случая заболевания, вызванного МПВ человека. В сезон 2022-2023 гг. было собрано 1314 образцов, ведущим этиологическим агентом явился РСВ – детектировался в 15,8%, далее наиболее часто выявлялся риновирус – в 11,2%. Парагрипп, энтеровирусы и МПВ были детектированы в 6,8%, 6,6% и 5,2%, остальные вирусы выявлялись менее чем в 5% образцов, в том числе и вирусы гриппа – в 4,2%. С октября 2023 г. по март 2024 г. было собрано 1214 образцов. Вирусы гриппа детектировались в 21,5%, вторым по частоте детекции стал РСВ – в 16,6%. Бокавирус детектировался в 11,7%. Риновирус, аденовирус, SARS Cov-2 и энтеровирусы – 8,2%, 6,9%, 7,6% и 6,1% соответственно. Остальные вирусы детектировались менее, чем в 5%.

Выводы. Нами были обнаружены значительные изменения структуры ОРВИ у детей во время пандемии COVID-19: доминирующими вирусами в сезон 2020-2021 гг. стали МПВ, риновирус и коронавирусы человека, детекция РСВ резко снизилась, вирусы гриппа не были обнаружены. В сезоны 2021-2024 гг. этиологическая структура ОРВИ вновь изменилась: вирусы гриппа и РСВ вновь стали ведущими агентами в структуре ОРВИ, в то время как МПВ не был обнаружен в 2021-2022 гг. и его детекция резко снизилась в последующие сезоны. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № № 19-74-10055п.

## **ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА А ПРИ ПОМОЩИ ПОВЕРХНОСТНО-УСИЛЕННОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В СОВОКУПНОСТИ С АЛГОРИТМАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**

*Табаров А.Т., Андреева О.В.*

*Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

В последние годы активно ведутся исследования для поиска новых методов диагностики вирусных заболеваний, при этом поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия (англ. Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS) является одним из наиболее перспективных методов. SERS позволяет усилить рассеяние рамановского сигнала исследуемого образца на поверхности наночастиц в  $10^6$ - $10^{11}$  раз и обнаружить патоген в следовых количествах. Усиление сигнала происходит за счёт возникновения плазмонного резонанса при взаимодействии электромагнитной волны лазерного излучения с электронами наночастиц. Для метода SERS используются специальные субстраты с нанесенными на них

наночастицами драгоценных металлов. При адсорбции вируса на субстрат можно получить спектр поверхностных белков вируса. Каждый вирус характеризуется своим уникальным спектральным отпечатком. Технология машинного обучения позволяет обнаружить даже небольшие изменения в спектре, которые свидетельствуют о наличии вируса в биологическом образце.

В нашем исследовании использовались субстраты с наночастицами серебра. Были получены спектры чистой буферной среды и вируса гриппа А в буферной среде. Для получения спектров использовался лазер с длиной волны 633 нм с выдержкой в 30 секунд. Для обработки и дифференциации спектров использовались различные методы, включая метод опорных векторов (SVM).

Для получения SERS-спектров использовались коммерческие гидрофильные субстраты с нанесенными наночастицами серебра. Размер частиц составлял порядка 100–200 нм. Образцы вируса гриппа предоставлены Научно-исследовательским институтом гриппа им. Смородинцева. Результат определения концентрации белка по методу Лоури в концентрированных вирусных суспензиях составил <200 мкг/мл. Титр гемагглютинации концентрата составил 1:256. Специфичность полученных вирусных концентратов была подтверждена тестом ELISA с использованием специфических моноклональных антител к гемагглютинирующему белку вирусов гриппа А.

Экспериментальная установка включала лазер с длиной волны 633 нм. Измерения проводились в диапазоне от 550 до 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Время экспозиции составляло 30 секунд.

Было получено всего 27 спектров (14 спектров чистой буферной среды и 13 спектров буферной среды, смешанной с вирусом гриппа типа А). Примеры спектров показаны на рисунке 1.

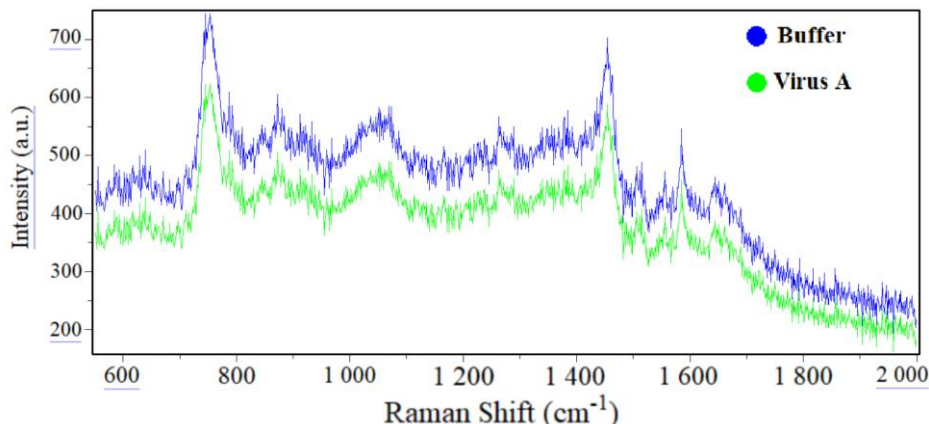


Рисунок 1. Примеры спектров чистой буферной среды (синий спектр) и буферной среды с добавлением вируса гриппа А

Затем был создан набор данных, в котором столбцами были длина волны, а строками — спектры. Дополнительная предварительная обработка включала нормализацию (чтобы значения находились в диапазоне от 0 до 1) и стандартизацию. Было использовано несколько методов для классификации спектров, и метод опорных векторов (SVM) показал наилучшие результаты.

В результате метод SVM позволил достичь точности разделения спектров до 88.89% без предварительной обработки и 100% точности с предварительной обработкой. Наша работа продемонстрировала возможность использования технологии SERS и машинного

обучения для быстрого (около 30 секунд) и точного обнаружения вируса гриппа типа А в биологическом образце.

## **ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ**

*Тарлавин Н.В.*

*ФГБОУ ВО СПбГУВМ, Санкт-Петербург, Россия*

В России, как и в других странах мира, птицеводческая отрасль является одной из ведущих, так как обеспечивает не только высококачественными натуральными продуктами питания, но и сырьем для промышленной переработки. Это стало возможным благодаря внедрению новых технологий, касающихся производства кормов и самой системы кормления птицы на фермах, но в тоже время из-за высокой скученности птицепоголовья и стрессовых факторов возрастает количество вспышек инфекционных болезней. Наиболее опасными из них являются вирусные болезни, среди которых высоко- и низкопатогенный грипп, болезнь Ньюкасла, ряд опасных бактериальных болезней, а также иммунодепрессивные болезни, вызывающие сильное падение иммунитета птицы, вследствие чего наблюдается повальная гибель птицы от вторичной микрофлоры (болезни Марека, Гамборо, аденовирусные болезни, инфекционная анемия). В попытке защититься от данных болезней ветеринарная наука разрабатывает и совершенствует ряд вакцин, которые на сегодняшний день принято относить к так называемым “вакцинам нового поколения” – иммунокомплексным, субъединичным, рекомбинантным, векторным и прочим.

На базе Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины была разработана иммунокомплексная вакцина, пригодная к введению 1-суточному цыпленку как внутримышечно, так и подкожно. Иммунокомплексная вакцина нового поколения обеспечивает доступный и простой метод защиты птицы от инфекционной бурсальной болезни. Механизм работы иммунокомплексной вакцины заключается в отложенной репликации вакцинного вируса в клетках фабрициевой сумки цыпленка, что позволяет дождаться снижения уровня материнских антител и успеть колонизировать клетки фабрициевой сумки раньше, чем это успеет сделать полевой штамм болезни Гамборо. Отложенная репликация вакцинного вируса достигается за счет взаимодействия иммунного комплекса с фолликулярными дендритными клетками. Когда связь между вируснейтрализующим иммуноглобулином и вакцинным вирусом ослабевает, вирус высвобождается в кровяное русло и получает возможность колонизировать клетки фабрициевой сумки, тем самым формируя иммунный ответ. Также вакцинный вирус распространяется по прочим органам птицы, участвующим в формировании иммунного ответа: селезенке, тимусу, миндалевидной железе. В качестве вакцинного штамма вируса использовался штамм «ВНИВИП», который обладает большим антигенным родством с циркулирующими на территории Российской Федерации штаммами инфекционной бурсальной болезни.

В рамках исследования вакцины был проведен ряд экспериментов на цыплятах кроссов Ломан Уайт и Росс-308. Иммунокомплексная вакцина вводилась цыплятам в

суточном возрасте. На 35 сутки титр антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни у цыплят кросса Ломан Уайт в среднем составлял 68 (контрольная группа) и 514 (вакцинированная группа) в ИФА. У цыплят кросса Росс-308 на 35-е сутки в опытной группе средний титр антител против вируса инфекционной бурсальной болезни составил 3240 в ИФА, при следовых значениях в контрольной группе. Таким образом, иммунокомплексная вакцина из штамма «ВНИВИП» позволяет проводить эффективную специфическую профилактику против инфекционной бурсальной болезни.

## **БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ У МЫШЕЙ ВИРУСА ГРИППА В С ДЕЛЕЦИЕЙ В С-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ БЕЛКА NS1**

*Шамакова Д.А., Кудря К.С., Загрядский Н.С., Романовская-Романько Е.А.,  
Сергеева М.В., Стукова М.А.*

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Неструктурный белок NS1 вируса гриппа, а именно его С-концевой домен, отвечает за ингибирование системы интерферона. Модификация С-концевого домена белка NS1 является многообещающей стратегией в создании вакцинных штаммов для живой вакцины против гриппа. Для вирусов гриппа А существует много публикаций, описывающих различные изменения в С-концевом домене белка NS1. Такие вирусы хорошо реплицируются в РКЭ и в то же время обладают более сильными иммуногенными свойствами по сравнению с вирусами дикого типа с полноразмерным белком NS1. Предполагается, что грипп В с аналогичными изменениями будет обладать таким же фенотипом как вирусы гриппа А с модифицированным NS1.

Цель исследования – характеристика репликативных и иммуногенных свойств вируса гриппа В с делецией в С-концевом домене белка NS1.

Материалы и методы: Рекомбинантный вирус гриппа В с делецией в С-концевом домене белка NS1 (В/Lee/NS1ΔС), полученный методом обратной генетики, и дикий вирус В/Lee/40, полученный из коллекции «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Репликативные свойства вирусов изучали в различных интерферон-компетентных системах (Calu-3, MDCK, РКЭ). Способность к продукции цитокина IL-6 изучали при заражении клеточной культуры Calu-3 (ATCC HTB-55) вирусами В/Lee/NS1ΔС и В/Lee/40. Концентрацию цитокина в клеточной среде измеряли методом ИФА.

Аттенуацию вирусов изучали *in vivo* (на модели мышей Balb/c). Мышам интраназально вводили 6 IgЭИД<sub>50</sub> вирусов В/Lee/NS1ΔС и В/Lee/40. В течение 14 дней следили за массой тела мышей. Вирусную нагрузку в носовых турбинах и легких смотрели на 3 и 5 дни после иммунизации. На 14 день у мышей взяли сыворотки крови для определения антигемагглютинирующих антител методом РТГА и БАЛ для оценки образования локальных антител IgА методом ИФА.

Результаты и обсуждение: Методом обратной генетики был получен вирус В/Lee/NS1ΔС, который хорошо реплицировался в клеточной культуре MDCK. Для улучшения репликативных свойств вируса В/Lee/NS1ΔС в РКЭ потребовалась адаптации



методом последовательных пассажей. При этом репликативные свойства В/Lee/NS1ΔС во всех трех интерферон-компетентных системах были ниже, чем у вируса В/Lee/40, содержащего полноразмерный белок NS1. В клетках Calu-3, зараженных вирусом В/Lee/NS1ΔС, продукция цитокина IL-6 была выше, чем у В/Lee/40.

Интраназальное заражение мышей вирусом В/Lee/NS1ΔС практически не приводило к снижению массы, к концу эксперимента выживаемость составляла 100%, в отличие от 100% летального вируса В/Lee/40. В легких и носовых турбинах мышей титр вируса В/Lee/NS1ΔС был ниже, чем В/Lee/40. После иммунизации вирусом В/Lee/NS1ΔС у мышей в сыворотках образовывались антигемагглютинирующие антитела (СГТ 18) и локальные антитела в БАЛ.

Выводы: Вирус В/Lee/NS1ΔС проявлял аттенуированный фенотип вирусов с укороченным белком NS1 и был иммуноген у мышей. Таким образом, вирус гриппа В с модификацией в С-концевом домене белка NS1 может стать перспективным кандидатом для создания живой вакцины против гриппа.

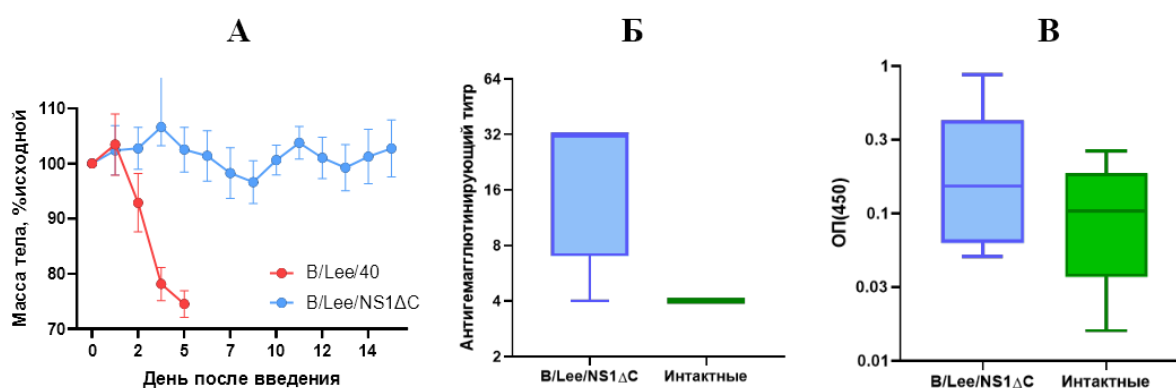


Рисунок 1. Безопасность и иммуногенность В/Lee/NS1ΔС в мышах. (А) Изменение массы мышей после иммунизации. (Б) Титр антигемагглютинирующих антител в сыворотках. (В) Уровень локальных IgA в БАЛ

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ЧАПАРЕ

*Широбокова С.А.<sup>1</sup>, Шабалина А.В.<sup>1</sup>, Сухих И. С.<sup>3</sup>, Долгова А.С.<sup>1</sup>, Дедков В.Г.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е.И. Марциновского, Москва, Россия

<sup>3</sup>University College Dublin, Дублин, Ирландия

В семейство Arenaviridae Нового Света входят высококонтагиозные зоонозные вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки и приводящие к летальным случаям в среднем в 25-30% среди населения. Все представители семейства плохо изучены в связи с

небольшим количеством зараженных. Одним из наименее исследованных является вирус Чапаре (вида *Mammarenavirus chapareense*) – возбудитель геморрагической лихорадки Чапаре (ГЛЧ), эндемичный патоген Боливии, впервые зафиксированный в Кочабамбе. Переносчик в естественной среде до сих пор не установлен, но есть предположения, что это грызуны из семейства Cricetidae, рода *Oligoryzomys*. Основным видом может быть *O. microtis*, т.к. РНК вируса была обнаружена в образцах тканей, полученных от 9 из 31 грызунов на территории Боливии. Лечение инфекции и вакцины к ГЛЧ не разработаны, а недавняя вспышка в 2019 году в Каранави, говорит о циркуляции вируса среди населения. Актуальность изучения вируса Чапаре заключается в системе раннего выявления и контроля по дальнейшему распространению патогена.

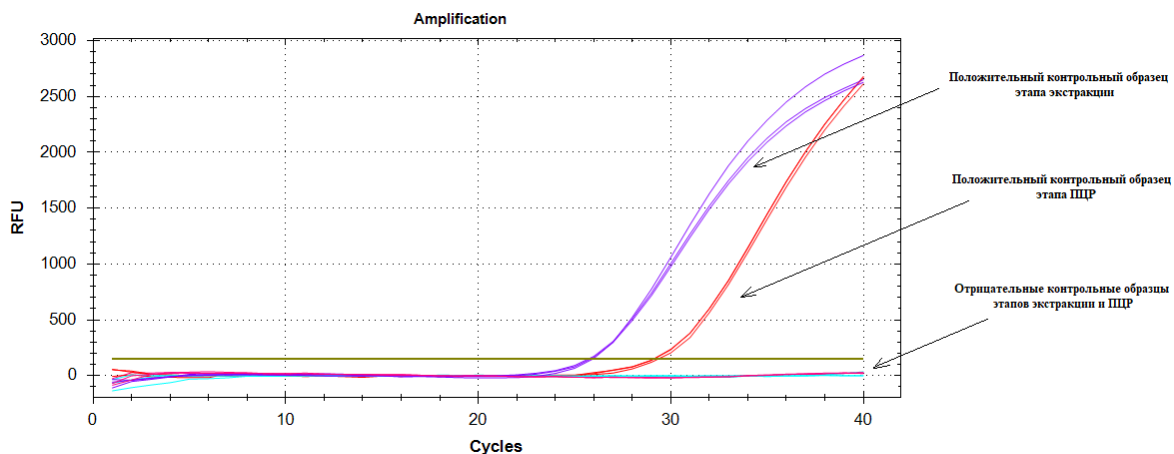
Целью исследования является разработка метода одноэтапного количественного анализа полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для обнаружения РНК вируса Чапаре в биологических образцах.

Был проведен анализ имеющихся полногеномных последовательностей в базе данных NCBI, их выравнивание и определение консервативных участков. В качестве мишени для посадки праймеров и зонда был выбран фрагмент гена L, кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса Чапаре. После чего подобраны праймеры и зонд, сконструированы рекомбинантные положительные контрольные ДНК образцы для мониторинга прохождения ПЦР и образцы на основе бактериофага MS2, для проверки качества этапа экстракции.

Тестирование данного метода на генетическом материале 13 видов вирусов показало 100% аналитическую специфичность. Предел обнаружения метода выявления РНК вируса Чапаре составил  $1 \times 10^4$  копий/мл. Кривая разведений стандартного образца была приближена линейной функцией; диапазон Ct от  $1 \times 10^6$  (Ct = 30,14-30,35) до  $10^4$  копий/мл (Ct = 36,04-37,41).

В результате проведенных исследований был разработан метод обнаружения РНК вируса Чапаре с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, применение которого позволит расширить спектр инструментов диагностики вируса Чапаре у лиц, прибывающих из эпидемиологически неблагоприятных по данной инфекции регионов.

Работа выполнена по федеральному проекту «Санитарный щит».



# **ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ**

Сборник тезисов  
Всероссийской конференции молодых ученых

Санкт-Петербург

11–12 апреля 2024 года

---

Подписано в печать 19.04.2024. Формат 60×84/16. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 4,25. Тираж 24. Заказ 1894.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного  
ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России,  
в Издательско-полиграфическом центре Политехнического университета.

195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.

Тел.: (812) 552-77-17; 550-40-14.

