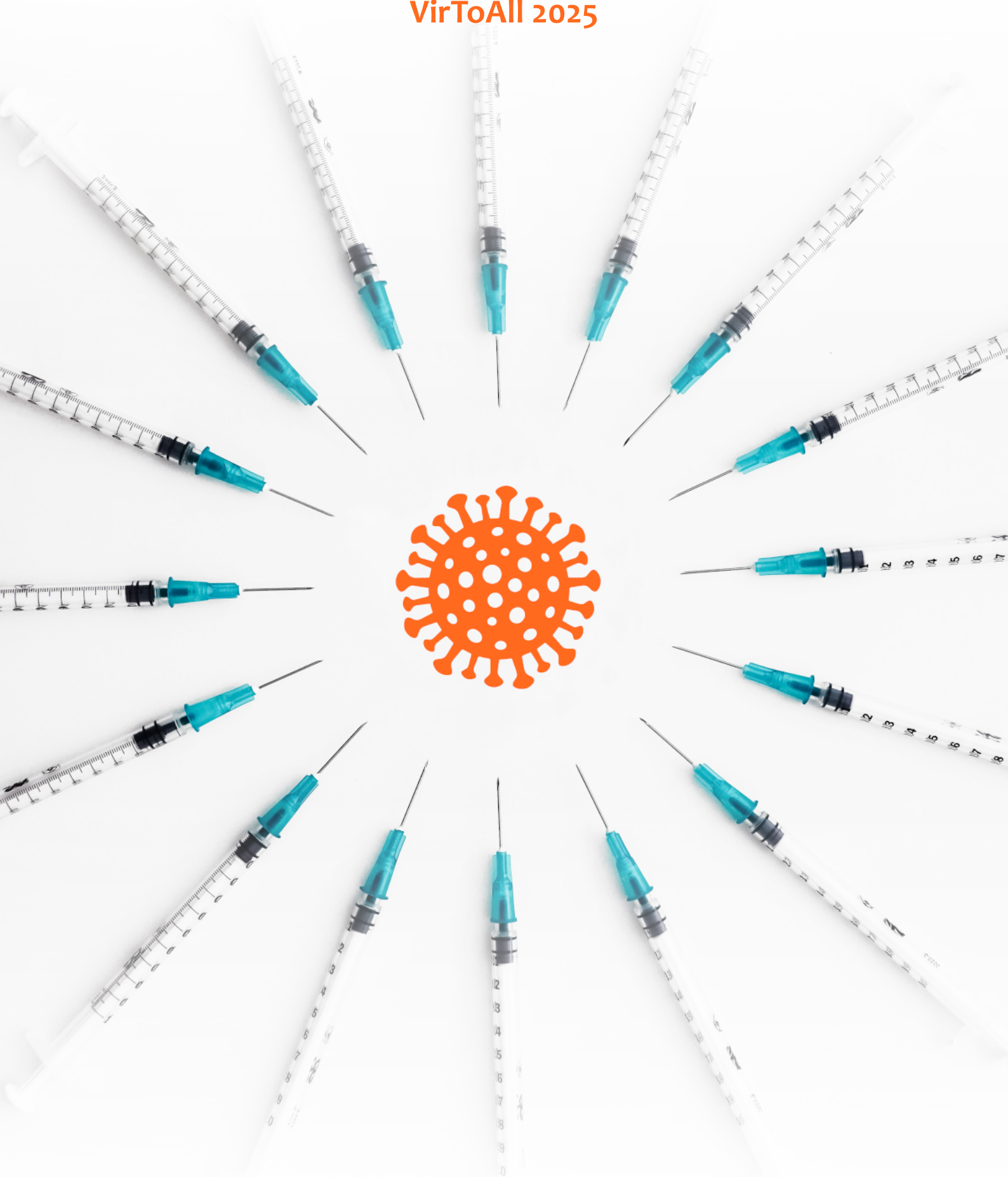


ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ — ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ VirToAll 2025



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,
посвященной 80-летию
со дня рождения академика РАН О. И. Киселева

Санкт-Петербург
10–11 апреля 2025 года



Санкт-Петербург
2025

УДК 578.7
ББК 28.3:52.63
В52

Вирусные инфекции – от диагностики к клинике : сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАН О. И. Киселева, Санкт-Петербург, 10–11 апреля 2025 г. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2025. – 84 с.

Материалы публикуются в авторской редакции.

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

ISBN 978-5-7422-8980-7

- © Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт
гриппа имени А. А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации, 2025
- © Jeremy Bezanger, Unsplash,
фото обложки, 2025
- © Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2025

К 80-летию со дня рождения академика РАН О.И. Киселева



Олег Иванович Киселев (1945-2015) – выдающийся ученый, видный организатор научных исследований и производства, внес существенный вклад в решение многих фундаментальных и прикладных задач в области молекулярной вирусологии, генной инженерии, химиотерапии, профилактики и эпидемиологии гриппа и других вирусных инфекций.

Научную ценность представляют работы Олега Ивановича по исследованию структуры генома вируса гриппа, роли отдельных генов и кодируемых ими белков в патогенности вируса, в устойчивости к химиопрепаратам, в ингибировании иммунных реакций макроорганизма. Ряд работ академика О.И. Киселева посвящен сравнительной вирусологии – сопоставлению биохимических особенностей и пространственной структуры детерминант патогенности у возбудителей тяжелых вирусных инфекций – гриппа А(Н5N1), лихорадки Эбола, ВИЧ-инфекции, а также прионных заболеваний.

Киселев О.И. систематизировал современные представления о потенциальных лекарственных мишенях в репликативном цикле вирусов, внес вклад в молекулярно-генетическое обоснование терапии гриппа этиотропными препаратами – блокаторами ионного канала белка М2, ингибиторами вирусной нейраминидазы, ингибиторами протеаз.

Олег Иванович инициировал новый цикл исследований и организационных решений по целенаправленному конструированию противовирусных препаратов, в том числе на полимерных носителях.

Фактически все препараты фармацевтического рынка Российской Федерации, предназначенные для лечения и профилактики гриппа, разработаны или при участии Института гриппа, или при его экспертной оценке.

Работа в столь актуальных направлениях, как разработка противогриппозных вакцин и противовирусных препаратов, сделала Олега Ивановича широко известным автором приоритетных публикаций. Он автор более 350 научных работ, включая 20 монографий, изданных в России и за её рубежами, 260 научных статей, 45 патентов на изобретения.

О.И. Киселев – являлся бессменным директором НИИ гриппа с 1988 по 2015 годы. За выдающиеся заслуги в области науки и техники, в 2004 году он был награжден премией Правительства РФ, медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, в 2014 году ему присвоили звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Доктор биологических наук, профессор, академик О.И. Киселев – один из наиболее ярких представителей медицинской науки, владевший пониманием фундаментальных основ биологии и механизмов решения практических проблем медицины. Врач по образованию, он видел свое призвание в первую очередь в решении актуальных проблем здравоохранения.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Алмежанова М.Д., Кожабергенов Н.С., Мелисбек А.М., Шыныбекова Г.О., Червякова О.В., Керимбаев А.А., Султанкулова К.Т.</i> РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	10
<i>Андреев С.А., Кононов А.В., Нестеров А.А.</i> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ АДЬЮВАНТОВ НА АНТИГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ «ВНИИЗЖ-БОВИРЕС-РСВИ»	11
<i>Аношко О.Н., Лапо Т.П., Савинова О.В., Сивец Н.В., Шмелёва Н.П.</i> СЛЕЖЕНИЕ ЗА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ	12
<i>Афанасьева П.В., Циммерман Е.Л., Елтаева Е.А., Добровольская О.А., Высочинская В.В.</i> ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ РНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ <i>IN VITRO</i> ТРАНСКРИПЦИИ МОДЕЛЬНЫХ МРНК	14
<i>Ахмедова Н.Ю., Кимирилова О.Г., Аракельян Р.С.</i> АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ У ДЕТЕЙ ПО АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ	16
<i>Бажина А.В., Котомина Т.С., Сычев И.А., Исакова-Сивак И.Н.</i> СОЧЕТАННАЯ ИММУНИЗАЦИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ С В-КЛЕТОЧНЫМИ ПЕПТИДАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕКРЕСТНО-ЗАЩИТНЫЙ ИММУНИТЕТ У МЫШЕЙ	17
<i>Большакова М.В., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Васильева А.Д., Бояринцева А.Ю., Петрова П.А., Шелепанова Т.Н., Замниус А.В.</i> АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА В, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В СЕЗОНАХ 2023-2024 ГГ. И 2024-2025 ГГ.	19
<i>Бровко Ю.В.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ВЫСОКОПАТОГЕННОМУ ГРИППУ ПТИЦ В ПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ РФ	20
<i>Бутенко А.А., Коробова З.Р.</i> ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ В-ЛИМФОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ПРИ COVID-19 И В ПОСТКОВИДНОМ СИНДРОМЕ	22
<i>Вон П.Ф., Степанова Е.А., Баженова Е.А., Дешева Ю.А., Кударь П.А., Шведова Т.Н., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.</i> РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЕЙ АНТИНЕЙРАМИНИДАЗНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ГРИППА ТИПА В ОБЕИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ	23

Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Козлов А.А., Никонова З.Б., Овчинникова Е.В., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ОСТРОВА САХАЛИН В 2022-2024 ГГ.	25
Гузенков Д.С., Соколовский Д.Д., Рекстин А.Р., Гупалова Т.В., Бормотова Е.А., Кударь П.А., Дешева Ю.А. АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ НЕЙРАМИНИДАЗЫ	26
Дроздовская П.А., Цинзерлинг В.А. СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ О БИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6 ТИПА И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМ КЛИНИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ	27
Есаулкова Я.Л., Чернышов В.В., Соколова А.С., Чулаков Е.Н., Яровая О.И., Краснов В.П., Зарубаев В.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПРОИЗВОДНЫХ ПУРИНА И КАМФОРЫ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ	29
Желтухина А.И., Иванова А.А., Венёв Е.В., Ёлишин Н.Д., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б. ВНЕДРЕНИЕ ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В РОССИИ В РАМКАХ ИНИЦИАТИВЫ ARBOVIRUS RESEARCHERS UNITE (ARU)	31
Загрядский Н.С., Шамакова Д.А., Сергеева М.В., Стукова М.А. ВЛИЯНИЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА БИОДОСТУПНОСТЬ МУКОЗАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ	32
Иванов Я.В., Фадеев А.В., Сукайло Д.А., Петрова П.А., Передерий А.А., Писарева М.М., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В РОССИИ В 2017-2024 ГОДАХ	33
Иголкина А.А., Черкасова П.В., Маркин И.В., Голева О.В., Чухловин А.Б., Базиян Е.В., Эйсмонт Ю.А., Рогозина Н.В., Васильев В.В., Готов О.С. ВОПРОСЫ ВЫБОРА БИОБРАЗЦОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА	34
Кацал К.С., Екимов А.А., Савина Н.Н., Анисенкова О.А., Зайцева Е.С. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА	35
Климова А.А., Комарова А.А., Галкина Т.С. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНИТЕТА У СОБАК ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИНЫ «КАРНИКАН-5R» ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ, ПАРВОВИРУСНОГО И КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТОВ, АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И БЕШЕНСТВА СОБАК	37

Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Карташов М.Ю. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ	38
Крупская М.Н., Дзагурова Т.К. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПАТОГЕННЫХ ХАБАРОВСК-ПОДОБНЫХ ХАНТАВИРУСОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ	40
Кудря К.С., Сергеева М.В., Шамакова Д.А., Красков Д.А., Тарлавин Н.В. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННО АКТУАЛЬНОГО КАНДИДАТНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А (H5N1)	42
Кулагина М.А., Волкова М.А., Чвала Ир.А., Осипова О.С., Ярославцева П.С., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2023 Г.	43
Ладыгина М.Д., Шуклина М.А., Шурыгина А.-П.С., Романовская-Романько Е.А., Ожерельева О.О., Варюшина Е.А. ГУМОРАЛЬНЫЙ, Т- И В-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ ПРИ МНОГОКРАТНЫХ ИММУНИЗАЦИЯХ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ У МЫШЕЙ	44
Литвинова В.Р., Рудомётова Н.Б., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А., Рудомётов А.П. РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДНК-ВАКЦИН, КОДИРУЮЩИХ ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ГРИППА ПОДТИПА А (H5NX)	47
Магомедова М.Ш., Бессонова Т.А., Ларина Н.С., Хапугина Д.А., Петраева И.П. СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ	48
Магомедова М.Ш., Ларина Н.С., Стрелкова Е.А., Шевцова Ю.П., Маркелова В.А. СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ «ДЕТСКИМИ» ИНФЕКЦИЯМИ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ДО 1 ГОДА	50
Магомедова М.Ш., Бессонова Т.А., Ларина Н.С., Хапугина Д.А., Алексашина Д.С., Вакалова К.А. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРИ У ДЕТЕЙ. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ	51
Малеева А.В., Шокина В.А., Найденышева З.К., Кудрявцев А.В. НА-СПЕЦИФИЧНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ СУЩЕСТВУЮЩИМИ Т-КЛЕТКАМИ ПАМЯТИ И НЕ ЗАВИСИТ ОТ СЕЗОННОЙ ВАКЦИНАЦИИ	52

Мороз Н.В., Фролов С.В., Долгов Д.Л., Кукленкова И.В. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ (H5) ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ «АВИФЛУВАК» НА ОСНОВЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАСЛЯНОГО АДЬЮВАНТА	54
Мустафаева А.С., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А., Шурыгина А.-П.С., Стукова М.А. ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВЕКТОРОВ <i>IN VITRO</i>	55
Олейник В.А., Плотникова М.А., Романовская-Романько Е.А. ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ (PRRS) У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ МЫШЕЙ В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ ГРИППА А	58
Осипова О.С., Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Грехнева А.Д., Зиняков Н.Г., Щербина А.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ НИЗКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H9N2 В 2024 Г.	60
Проценко М.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Теплякова Т.В. ЭКСТРАКТЫ КУЛЬТИВИРУЕМОГО МИЦЕЛИЯ НЕМАТОФАГОВОГО ГРИБА <i>DUDDINGTONIA FLAGRANS</i>, ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ	61
Рак А.Я., Добровольская О.А., Баженова Е.А., Матюшенко В.А., Прокопенко П.И., Елпаева Е.А., Исакова-Сивак И.Н. ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОТИПОВ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ГРИППА А	62
Родионова К.Н., Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Кудрявцев И.В., Исакова-Сивак И.Н. ФОРМИРОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ В ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КИШЕЧНИКА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ	65
Симакова Я.В., Гуцин В.А., Семененко Т.А., Огаркова Д.А. АКТУАЛЬНОСТЬ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВНОВЬ ВОЗНИКАЮЩИМ ПАТОГЕНАМ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СХЕМ ВАКЦИНАЦИИ (НА ПРИМЕРЕ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН)	66
Солошенко А., Шмелев А., Фомина С., Никифоров В. ИЗУЧЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА В РАМКАХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА	67
Тигеева Е.В., Яковлев В.А., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Вахитов Д.И., Макарова К.П., Кисаков Д.Н., Рудометова Н.Б., Рудометов А.П., Карпенко Л.И. ДНК-ВАКЦИННЫЕ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩИЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА КЭ, ИНДУЦИРУЮТ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ	69

<i>Туйчиев Л.Н., Рахимов Р.Р., Миркасымова Х.Х., Рузметова С.И., Мухамедова Н.М.</i> ВИРУСНЫЕ КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ В СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ ДИАРЕЙ	70
<i>Фалалеева Д.А., Плотникова М.А., Клотченко С.А.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА FM08	71
<i>Фаттахлы Г.Г., Роганова И.В.</i> СЛУЧАЙ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ	73
<i>Флорен А.М., Ажойчик Е.В., Большакова М.В., Царева Т.Р., Сорокин Е.В.</i> ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА В/RHODE ISLAND/01/2019	74
<i>Чернышева А.Е., Короткова И.А., Пузанов З.С., Маркарян А.Ю.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА ВЫДЕЛЕННОГО У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ В Г. ЕКАТЕРИНБУРГЕ	75
<i>Шайтарова Е.Б., Мусаева Т.Д., Ёлишин Н.Д., Комиссаров А.Б.</i> ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА СВИНЕЙ (PNEV) В РОССИИ	77
<i>Шамакова Д.А., Шуклина М.А., Ожерельева О.О., Шурыгина А.П.-С., Сергеева М.В., Стукова М.А.</i> КРОСС-ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИРУСА ГРИППА В С УКОРОЧЕННЫМ БЕЛКОМ NS1	78
<i>Шыныбекова Г.О., Кожабергенов Н.С., Бопи А.К., Алмежанова М.Д., Жаксылык С.Б., Червякова О.В., Керимбаев А.А, Султанкулова К.Т.</i> РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРС МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ	80
<i>Яковлев В.А., Литвинова В.Р., Рудометова Н.Б., М.Б. Боргоякова, Тигеева Е.В., Старостина Е.В., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Ильичев А.А.</i> СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ И СТРУЙНОЙ ИНЪЕКЦИИ КАК СРЕДСТВ ДОСТАВКИ МРНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА А (H5NX)	82

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

*Алмежанова М.Д., Кожабергенов Н.С., Мелисбек А.М., Шыныбекова Г.О.,
Червякова О.В., Керимбаев А.А., Султанкулова К.Т.*

*ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
АО «Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Жамбылская область,
Казахстан*

Исследования в области разработки и применения экспресс методов для диагностики вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 на основе ОТ-ПЦР в реальном времени актуальны и проводятся во многих странах мира. Создание отечественной мультиплексной тест-системы для дифференциальной диагностики вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 обусловлено необходимостью ранней диагностики заболевания.

Согласно ежегодной статистике ВОЗ регистрируется приблизительно 1 миллиарда случаев сезонного гриппа, из которых от 3 до 5 млн. являются тяжёлыми. От заболеваний дыхательных путей, вызванных гриппозными вирусами, ежегодно умирает от 290 000 до 650 000 людей.

В последнее время возникновение и быстрое распространение нового вида коронавируса – SARS-CoV-2, который стал значимым представителем острых респираторных заболеваний, вызвало серьезные опасения в области глобального здравоохранения. С момента обнаружения SARS-CoV-2 вирус стремительно охватил более 230 стран. По данным ВОЗ по состоянию на январь 2025 года зарегистрировано свыше 777 млн. случаев заболевания по всему миру; подтверждено более 7 млн. летальных исходов заболевания, что делает пандемию COVID-19 одной из самых смертоносных в истории.

В настоящее время в Казахстане есть необходимость в разработке новейших средств раннего выявления коронавируса и гриппа одновременно, основанных на применении ОТ-ПЦР РВ тест-систем, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью. В связи с этим, нашей целью исследования была разработка тест-системы для дифференциальной диагностики гриппа и коронавируса методом мультиплексной ОТ-ПЦР РВ, где объектом исследования являются вирусы гриппа А и SARS-CoV-2. В результате, впервые в Казахстане разработана мультиплексная диагностическая тест-система для выявления РНК вируса гриппа и коронавируса.

Разработанная мультиплексная ПЦР тест-система позволяет в ходе одного анализа одновременно выявлять два вирусных патогена – грипп типа А и коронавирус человека SARS-CoV-2, а также контролировать прохождение реакции амплификации с помощью внутреннего контрольного образца. Таким образом, задействовано два канала амплификатора, что позволяет дифференцировать вирусы гриппа и коронавируса человека.

В наших исследованиях по подбору специфических праймеров и зондов в качестве гена-мишени для обнаружения вируса гриппа А был выбран М ген, а вируса SARS-CoV-2 – RdRp ген. Выбор генов был обусловлен наличием уникальных консервативных последовательностей, позволяющие подобрать специфичные пары праймеров и зонды для обнаружения коронавируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа А. В качестве флуоресцентных

красителей использовали FAM, ROX и гасители BHQ-1 и BHQ-2. Провели оптимизацию реакционной ПЦР-смеси с добавлением сконструированных нами видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для амплификации РНК вируса гриппа и коронавируса. Оптимизировали температурный режим амплификации ПЦР-продуктов с помощью градиентной постановки ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени.

Специфичность разработанной тест-системы экспериментально проверена с РНК вирусами SARS-CoV-2, MERS-CoV, гриппа типов А и В. В результате установлено, что в пробах, содержащих РНК вирусы гриппа А и SARS-CoV-2 были получены специфические ПЦР-продукты, а в пробах с родственными вирусами РНК – отрицательные результаты, что указывает на высокую специфичность тест-системы. В ходе экспериментов установлено, что данный метод характеризовался высокой аналитической чувствительностью от 5 до 10 аттограмм, что составляет 1-2 копий молекул РНК вирусов SARS-CoV-2 и гриппа А в одной реакции. Этот показатель является приемлемым для использования их в диагностических наборах тест-систем.

Разработанная тест-система для диагностики гриппа и коронавируса с помощью мультимплексной ОТ-ПЦР РВ по сравнению с традиционными методами позволяет в короткое время определить возбудителя или микст-инфекцию, способствует своевременной профилактике и предотвращению распространения гриппа и коронавирусной инфекции.

Данная работа выполнена в рамках ПЦФ: «Разработка новых диагностических тест-систем для особо опасных вирусных инфекций» (ИРН BR24992948).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ АДЬЮВАНТОВ НА АНТИГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ «ВНИИЗЖ-БОВИРЕС-РСВИ»

Андреев С.А., Кононов А.В., Нестеров А.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

ФГБУ «ВНИИЗЖ» постоянно ведёт работу по повышению эффективности выпускаемых препаратов, в том числе путём подбора новых адъювантов. Одно из исследований в данном направлении проводилось на основе нового препарата «ВНИИЗЖ-БовиРес-РСВИ», вакцины ассоциированной против парагриппа-3 (ПГ-3), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД) и респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВИ) КРС эмульсионной инактивированной. С целью повышения эффективности препарата на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводилось испытание различных адъювантов в составе вакцины.

Образцы экспериментальных образцов вакцин изготовлены из инактивированных 1,2-аминоэтилазиридином культуральных суспензий штаммов вирусов ПГ-3 КРС, ИРТ, ВД КРС и вируса РСВИ, с инфекционной активностью штаммов не менее $1,0 \times 10^6$ ТЦД₅₀. В ходе испытания были произведены экспериментальные образцы вакцины, основанных на 4 разных адъювантах: Coralvac AT318, MontanideTM ISA 70, Muctavac 70, Liksir Каприлик. Эмульгирование проводилось согласно техническим рекомендациям производителя

адьювантов. В ходе тестирования на стабильность эмульсии, образец на основе Liksir Каприлик показал нестабильность и выпадение антигенна в нижней части флакона и был снят с дальнейших испытаний.

Испытание оставшихся образцов проводилось с использованием лабораторных животных – 12 кроликов, разделённых на 3 группы. Вакцину вводили внутримышечно двукратно с интервалом 21 день в дозе 2 мл. В пробах крови, отобранных на 21 и 35 сутки, методом ИФА определялся титр антител.

В ходе проведённых исследований были установлены среднегрупповые значения титров антител на 21 день образца вакцины на адьюванте Coralvac AT318 к РСВИ - 1:8, ПГ-3 - 1:1600, ИРТ - 1:1600, ВД - 1:3200, на адьюванте MontanideTM ISA 70 к РСВИ - 1:8, ПГ-3 - 1:800, ИРТ - 1:200, ВД - 1:1600, на адьюванте Muctavac 70 к РСВИ - 1:4, ПГ-3 - 1:400, ИРТ - 1:400, ВД - 1:800. Через 14 дней после проведения бустерной вакцинации, на 35 день после начала вакцинации регистрировали прирост титров антител до отметок РСВИ - 1:32, ПГ-3 - 1:3200, ИРТ - 1:6400, ВД - 1:6400, на адьюванте MontanideTM ISA 70 к РСВИ - 1:16, ПГ-3 - 1:3200, ИРТ - 1:1600, ВД - 1:6400, на адьюванте Muctavac 70 к РСВИ - 1:16, ПГ-3 - 1:1600, ИРТ - 1:1600, ВД - 1:6400.

Для выявления антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД интерпретация результата по титру антител оценивалась по следующим критериям: титр $\geq 1:200$ – положительный, титр $< 1:200$ – отрицательный. Для выявления антител к вирусу РСВИ интерпретация результата по титру антител: титр $\geq 1:2$ – положительный, титр $< 1:2$ – отрицательный.

При проведении осмотра мест введения препаратов было установлено: образцы с добавлением адьювантов Coralvac AT318 и MontanideTM ISA 70 не вызвали никаких изменений в местах введения, что свидетельствует о безвредности адьювантов для тканей организма. Результаты вскрытия мест инъекции образца вакцины на адьюванте Muctavac 70 показали наличие выраженных изменений в мышечной ткани – образование зернистых гранулём.

Все образцы вакцины, за исключением препарата основанного на адьюванте Liksir Каприлик, показали стабильность эмульсии и стабильный прирост титров антител в среднем на $2,0 \log_2$. По результатам испытаний, самый высокий титр антител показал образец на адьюванте Coralvac AT318, так же данный образец не вызвал никаких изменений в тканях на месте введения.

СЛЕЖЕНИЕ ЗА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Аношко О.Н., Лапо Т.П., Савинова О.В., Сивец Н.В., Шмелёва Н.П.

Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: респираторно-синцициальный вирус, грипп, дозорное эпидемиологическое слежение, Республика Беларусь.

Введение: Этиологическая структура возбудителей ОРВИ разнообразна и на данный момент насчитывает более 200 инфекционных патогенов, способных вызывать заболевания различной степени тяжести. Так, инфекции, обусловленные вирусами гриппа, респираторно-синцитиальным вирусом (далее – РС-вирус) и SARS-CoV-2 вносят значительный вклад в инфекционную заболеваемость во всем мире, причиняя существенный вред здоровью населения и всей системе здравоохранения в целом.

Целью исследования являлось проанализировать частоту встречаемости РС-вируса в условиях распространения гриппа и инфекции COVID-19. Исследование проводили в рамках дозорного и рутинного эпидемиологического слежения за гриппом и ОРВИ в период с 40 календарной недели (далее – к.н.) 2020 г. по 8 к.н. 2025 г.

Материал для исследования: назофарингеальные мазки, полученные от пациентов всех возрастов с клиническими проявлениями респираторных заболеваний. Образцы исследовали на наличие генетического материала РС-вируса, вирусов гриппа A/B и SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, для анализа заболеваемости использовали данные автоматизированной информационной системы «Заболеваемость ОРИ» по стране.

Результаты. В настоящее время в Республике Беларусь эпидемиологическое слежение за РС-вирусом входит в дозорное слежение за гриппом, SARS-CoV-2 и другими респираторными патогенами. Проведенное исследование позволило оценить частоту встречаемости вирусов гриппа, SARS-CoV-2 и РС-вируса. Активное распространение возбудителя инфекции COVID-19 в 2020 году, а также проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение распространения заболевания, способствовало вытеснению в 2020-2021 гг. из ежегодной циркуляции вирусов гриппа и РС-вируса. Однако, сезон 2021-2022 гг. ознаменовался возвращением в сезонную циркуляцию вирусов гриппа и РС-вируса (рисунок 1).

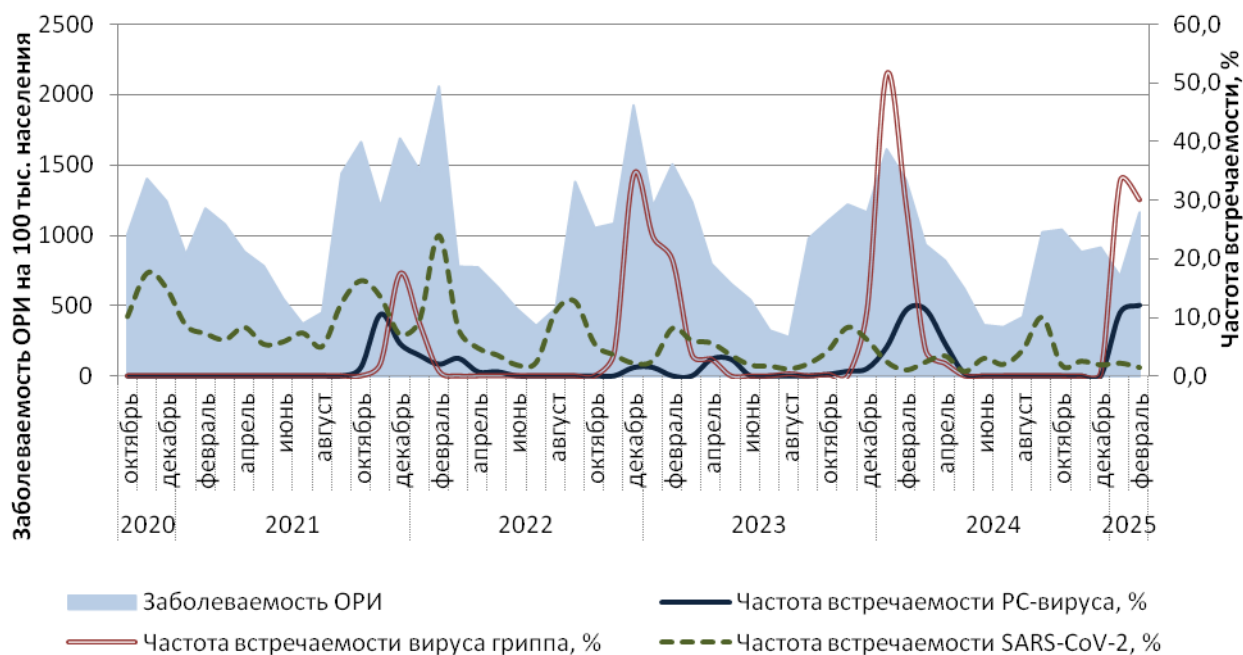


Рисунок 1 – Динамика частоты выявления РС-вируса, вирусов гриппа и SARS-CoV-2 в сочетании с заболеваемостью ОРИ в Беларуси с 40 к.н. 2020 г. по 8 к.н. 2025 г.

Активная циркуляция РС-вируса в 2021-2022 гг. началась уже на старте эпидемического сезона, достигнув максимального значения частоты встречаемости возбудителя на 44 к.н. 2021 г. – 10,5 %. В это время в сезонную циркуляцию включились вирусы гриппа и наблюдалась совместная циркуляция данных патогенов. Период встречаемости РС-вируса продлился до апреля 2022 года. В сезоне 2022-2023 гг. случаи респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (далее – РСВИ) регистрировали с ноября по май, но частота выявления возбудителя в этот период не превышала 2,8 %.

В эпидемические сезоны 2023-2024 гг. и 2024-2025 гг. частота встречаемости РС-вируса достигала значений выше 10,0 %, что говорит об эпидемической значимости возбудителя РСВИ, наряду с гриппом и коронавирусной инфекцией. Однако начало активной циркуляции РС-вируса регистрировали позже – с января по апрель в 2023-2024 гг., и с января по текущее время (8 к.н. 2025 г.) в 2024-2025 гг. Активная циркуляция РС-вируса совпала с сезонной активностью вирусов гриппа. Максимальные значения частоты встречаемости РС-вируса отмечали в марте 2024 года (сезон 2023-2024 гг.) и феврале 2025 года (2024-2025 гг.), которые составили 11,3 % и 12,1 % соответственно.

Выводы: Широкая распространенность SARS-CoV-2 повлияла на сезонную циркуляцию вирусов гриппа и РС-вируса в 2020-2021 гг. В последующие эпидемические сезоны показана одновременная циркуляция РС-вируса и вирусов гриппа. Наибольшая частота выявления РС-вируса отмечалась во время сезонных подъемов заболеваемости ОРВИ в осеннее-зимнее и зимне-весеннее время.

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ РНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ *IN VITRO* ТРАНСКРИПЦИИ МОДЕЛЬНЫХ МРНК

*Афанасьева П.В.^{1,2}, Циммерман Е.Л.^{1,2}, Елпаева Е.А.², Добровольская О.А.²,
Высочинская В.В.²*

¹*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия*

²*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия*

В современной вакцинологии технология создания вакцин на основе матричной РНК (мРНК) является одной из наиболее перспективных платформ ввиду возможности оперативно реагировать на новые и быстро мутирующие патогены. Разработка новых высокоэффективных вакцин до сих пор остается актуальной задачей. В данном исследовании мы оценивали влияние элементов структуры мРНК: последовательность Козак, 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTRs) гена α -глобина человека и внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) на эффективность трансляции зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в клеточной линии ВНК-21. Результаты показали: мРНК эффективно доставляются и транслируются *in vitro* и могут быть успешно использованы для дальнейших экспериментов в качестве новых экспериментальных платформ мРНК-вакцин.

Цели данной работы - получение методом *in vitro* транскрипции (IVT) оптимизированных молекул мРНК, кодирующих последовательность eGFP и оценка эффективности трансляции синтетических мРНК.

Были разработаны оригинальные генетические конструкции, кодирующие ген eGFP с и без последовательности Козак (pJet-eGFP-K, pJet-eGFP), с 5'- и 3'- UTRs гена α -глобина человека (pUC57-T7-eGFP-HBA), с IRES структурой (pIRES-eGFP-HBA).

Для синтеза мРНК методом IVT были использованы наборы реагентов компании «Jena Bioscience» (Германия). С целью повышения уровня трансляционной активности мРНК были применены модифицированные нуклеотиды компании ООО «Биолабмикс» (Россия). В качестве матрицы для реакции IVT использовали плазмидные ДНК, линейаризованные по сайтам рестрикции: pJet-eGFP и pJet-eGFP-K по сайту HindIII (№ 6 и 3), pIRES-eGFP-HBA и pUC57-T7-eGFP-HBA по сайту NotI сразу после гена (№ 1 и 2) и через 250 нуклеотидов после гена по сайтам BglII и SapI (№ 4 и 5), соответственно. Для разрушения матричной плазмидной ДНК после проведения реакции IVT пробу, содержащую реакционную смесь, подвергали ДНКазной обработке. Далее мРНК очищали с помощью набора RNA Clean & Concentrator (Zyma research, США). Концентрации мРНК были измерены на флуориметре Qubit-4. Верификацию образцов мРНК производили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Размеры транскриптов соответствовали теоретически рассчитанным.

Для оценки эффективности трансляции была проведена трансфекция полученных мРНК в клеточную линию ВНК-21 с использованием коммерческого липосомального трансфекционного реагента Lipofectamine MessengerMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific). Через 24 часа после трансфекции с помощью флуоресцентной микроскопии были получены изображения экспрессированных белков eGFP в клетках. Методом проточной цитофлуориметрии был проведен анализ доли трансфицированных клеток (%) и средней интенсивности флуоресценции (СИФ). В качестве контрольной мРНК была использована генетическая конструкция, кодирующая только eGFP. Результаты показали, что все полученные синтетические мРНК эффективно доставляются и транслируются. Наибольшую эффективность продемонстрировали образцы мРНК с элементами 5'- и 3'-UTRs, полученных при линейаризации матрицы сразу после гена.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России «Разработка технологической платформы для создания терапевтических мРНК, направленных на лечение гриппа» №TVKQ-2024-0006. Проведение проточной цитофлуориметрии было выполнено при поддержке сотрудников лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

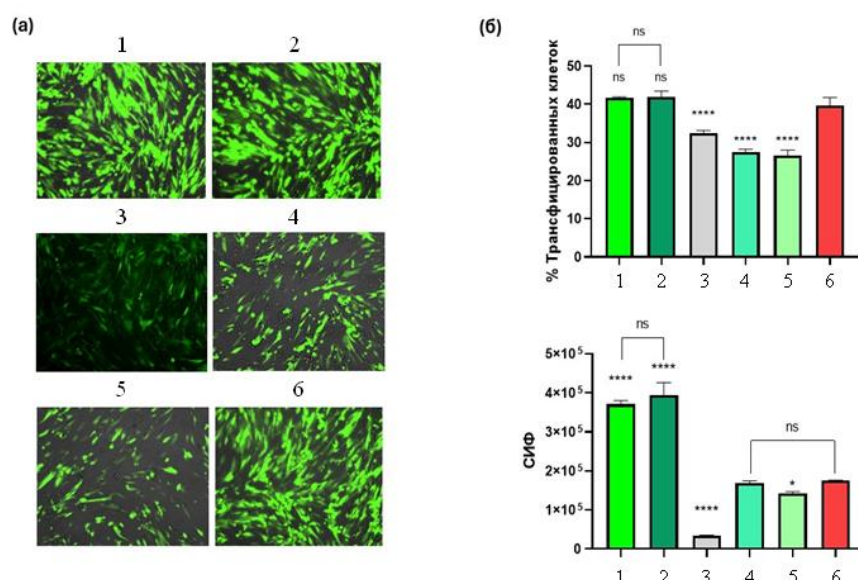


Рисунок 1 – Эффективность трансфекции клеток ВНК-21 синтетическими мРНК.

(а) Флуоресцентная микроскопия клеток. Зеленый – eGFP (б) – Проточная цитофлуориметрия. СИФ - средняя интенсивность флуоресценции. Статистические данные получены с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA): ****— $p < 0.0001$; *— $p < 0.05$; $p > 0.05$ (not significant – ‘ns’)

АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ У ДЕТЕЙ ПО АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Ахмедова Н.Ю., Кимирилова О.Г., Аракельян Р.С.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», г. Астрахань, Россия

Ключевые слова: грипп, дети, заболеваемость, клинические проявления, профилактика.

Цель работы. Провести анализ заболеваемости детей в Астраханской области в период с 2019 по 2024 год с целью улучшения эффективности профилактических мероприятий.

Материалы и методы. С целью изучения заболеваемости в разных возрастных группах, нами были исследованы медицинские карты (форма №003/у) 3436 детей, проходивших лечение в медучреждениях Астраханской области, а именно в «Детской городской поликлинике №4» и Областной инфекционной клинической больнице им. А.М. Ничоги. Был проведен анализ медицинской документации (форма №003/у) указанного числа пациентов, лечившихся в Областной инфекционной клинической больнице им. А.М. Ничоги. Первая группа ($n=288$) включала детей в возрасте от 8 месяцев до 1 года, вторая ($n=1927$) – от 1 года до 7 лет, а третья ($n=1221$) – от 7 до 17 лет. Данное исследование проводилось на базе «Центра гигиены и эпидемиологии в Астраханской области» при финансовой поддержке из федерального бюджета, а также Астраханского государственного

медицинского университета, также финансируемого Министерством здравоохранения Российской Федерации из федерального бюджета.

Результаты. По проведенному анализу заболеваемости гриппом у детей в период с 2019 по 2024 год доминирующим вирусом гриппа у детей являлся вирус А(Н3N2). Типичные проявления гриппа у юных пациентов включали повышенную температуру, общее недомогание, резкую утомляемость, цефалгию, мышечные и суставные боли. У ряда детей наблюдались также болезненные ощущения при глотании, ринорея, кашель, рвота и диарея.

За весь период изучения и анализа было выявлено более 60% случаев гриппом у детей. Выявленные случаи были зарегистрированы в трех возрастных группах: первая - от 8 месяцев до 1 года, вторая - от 1 года до 7 лет и третья - от 7 до 17 лет.

Регистр пациентов с гриппом у детей относится к периоду с 2019 по 2024 год. Уровень диагностирования гриппа у детей за данный промежуток времени в первой группе составил 8,4% (n = 288), во второй - 56,1% (n = 1927), в третьей - 35,5% (n = 1221). Самая высокая частота диагностирования была отмечена в 2020 году - 34,6% (n = 1098). В данном году показатели были следующими: 1-я возрастная группа составила 7,7% (85 случаев), 2-я группа - 58,7% (n = 644) и 3-я группа - 33,6% (n = 369). Самый низкий уровень у детей наблюдался в 2024 году 7,8% (n = 273), 16,8% (n = 46) в первой группе возрастом от 8 месяцев до 1 года, 39,9% (n = 109) во второй (от 1 года до 7 лет) и 43,3% (n = 118) в третьей. Большинство случаев гриппа было зарегистрировано у детей в городских районах - 93,6% (n = 3216).

Заключение. Выявлен высокий уровень частоты диагностирования гриппа у детей в Астраханской области в период с 2019г. по 2024г. Самый высокий – в 2020 г. самый низкий – в 2024 г. Наиболее пораженной возрастной группой были дети в возрасте от 1 года до 7 лет.

Полученные сведения способствуют углубленному пониманию особенностей гриппа у детей и позволяют разрабатывать более эффективные стратегии профилактики и терапии. Обеспечение здоровья детей – задача первостепенной важности для родителей, медицинских специалистов и государственных структур. Лишь посредством скоординированных действий возможно достижение снижения заболеваемости гриппом среди детей и создание благоприятных условий для здоровья будущих поколений.

СОЧЕТАННАЯ ИММУНИЗАЦИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ С В-КЛЕТОЧНЫМИ ПЕПТИДАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕКРЕСТНО-ЗАЩИТНЫЙ ИММУНИТЕТ У МЫШЕЙ

Бажина А.В., Котомина Т.С., Сычев И.А., Исакова-Сивак И.Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Вирус гриппа – одна из основных причин острых респираторных инфекций человека. Вакцинация является наиболее действенным средством борьбы с гриппозной инфекцией. Однако эффективность доступных в настоящее время противогриппозных вакцин зависит от совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов. Кроме того, вирусы гриппа характеризуются генетической изменчивостью, что требует ежегодного обновления состава

вакцин и проведения массовых компаний по ревакцинации населения. Поэтому есть необходимость в разработке вакцин, охватывающих большее количество штаммов и способных формировать длительный иммунный ответ у привитых, что можно достичь включением в их состав наиболее консервативных областей белков вируса гриппа. В условиях данной стратегии активно исследовались консервативные области гемагглютинаина (НА) как основного поверхностного гликопротеина вируса гриппа, и в меньшей степени обращено внимание к нейраминидазе (NA). Настоящая работа сфокусирована на изучении кросс-протективных свойств формалин-инактивированной гриппозной вакцины iPR8 при добавлении к ней пептидов, соответствующих линейным В-клеточным эпитопам нейраминидазы.

С помощью биоинформатического анализа были выявлены линейные эпитопы NA, высококонсервативные среди вирусов гриппа А, и синтезированы соответствующие данным эпитопам пептиды, обозначенные Vir 1-7. Мышей линии BALB/с трижды с интервалом в две недели внутримышечно иммунизировали вакцинной композицией, состоящей из инактивированной гриппозной вакцины iPR8 и пептида (Vir 1-7). Через две недели после последней иммунизации у мышей собирали кровь и выделяли сыворотку. Спустя 2 суток мышей заражали гетерологичными вирулентными вирусами A/California/07/09 MA (адаптированный к мышам вирус H1N1pdm09) и A/Philippines/2/82 (H3N2) в дозе 10 LD50. Впоследствии производили ежедневное наблюдение за изменениями массы тела и выживаемостью животных. С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотках иммунизированных мышей определяли уровень IgG антител к вирусам гриппа, в том числе к реассортантному штамму rg H6N1, который обладает NA от вируса PR8 и NA от неродственного штамма вируса гриппа A/H6N1.

По результатам исследования добавление к iPR8 одного из пептидов SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6), VELIRGRK (Vir-7) повышало выживаемость мышей после заражения вирусом Cal09 MA, по сравнению с группой iPR8. Кроме того, в перечисленных группах выживаемость после заражения гетерологичным вирусом H3N2 составляла 50–60%, в то время как показатель в группах PBS и iPR8 составлял 17–20%.

Показано, что добавление любого из пептидов Vir к iPR8 не влияло на выработку IgG антител к вирусу гриппа PR8. Было обнаружено, что уровень IgG антител к вирусу H6N1 был статистически значимо выше в группе мышей, иммунизированных комбинацией инактивированной гриппозной вакцины iPR8 с пептидом VELIRGRK (Vir-7) по сравнению с группой iPR8, что указывает на прирост анти-NA IgG антител к штамму PR8 при сочетанной иммунизации. При этом в настоящем исследовании не были выявлены антитела, ингибирующие ферментативную активность NA.

По результатам работы можно сделать вывод, что линейные В-клеточные эпитопы нейраминидазы вируса гриппа А являются перспективной мишенью для создания вакцин широкого спектра действия.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ FGWG–2025–0015.

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА В, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В СЕЗОНАХ 2023-2024 ГГ. И 2024 -2025 ГГ.

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

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

Вирусы гриппа В по уровню вирулентности, контагиозности и эпидемиологическому распространению занимают значительное место среди гриппоподобных заболеваний. Этим обусловлена важность непрерывного этиологического мониторинга и изучения процессов эволюционной изменчивости возбудителей гриппозной инфекции, проводимых на базе Национальных центров по гриппу.

Вирусы гриппа В подразделяются на две антигенные линии: Виктория и Ямагата. По сообщениям ВОЗ, вирус гриппа В линии Ямагата не циркулирует в популяции с марта 2020 года, поэтому антиген данной линии в качестве компонента вакцины может использоваться, но не является необходимым. Вирусы гриппа В Викторианской линии ежегодно циркулируют в популяции людей преимущественно во второй половине эпидемического сезона (с января по май). В течение сезона 2023-2024 гг. на базе Национального Центра по гриппу ВОЗ (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» МЗ России) было выделено 23 штамма гриппа В на клеточной культуре MDCK, что составило 5,6% от всех изолированных вирусов гриппа. С 40-й недели 2024 года по 10-ю неделю 2025 года выделено 38 вирусов гриппа В, что составляет 20,4%. В текущем сезоне выделение вирусов гриппа проводилось на двух системах: культуре клеток MDCK и куриных эмбрионах. Получение эмбриональных штаммов гриппа В является важной и актуальной задачей, так как большинство гриппозных вакцин и диагностических препаратов производится на системе развивающихся куриных эмбрионах. На текущий момент сезона 2024-2025 гг. изолировано 2 вируса гриппа В на куриных эмбрионах, 32 - на клеточной культуре MDCK, и 4 – на обеих системах.

Одним из важных этапов в определении штаммового состава гриппозных вакцин является оценка изменчивости циркулирующих вирусов гриппа. В рамках мониторинга распространения гриппозной инфекции на территории РФ в НЦГ ВОЗ проводятся детальные антигенный и генетический анализы, позволяющие сделать вывод об эволюции вирусов и целесообразности замены вакцинных штаммов. В течение рассматриваемого периода было проанализировано 75 вирусов гриппа В.

На антигенной карте, составленной на основе результатов РТГА, вирусы гриппа В предыдущего и текущего сезонов расположились на большей дистанции от штамма В/Австрия/1359417/21 (вакцинный штамм Северного полушария с 2022 года) в сравнении с вирусами более ранних сезонов. Это свидетельствует о незначительном продолжающемся антигенном дрейфе, который подтверждается результатами филогенетического анализа. Вирусы гриппа В предыдущего и текущего сезонов относятся к тому же клайду, что и референс-штамм В/Австрия/1359417/21 (Викторианская линия) – V1a.3A.2. Однако вирусы последних сезонов выделены в отдельные субклайды – С.5.1 и С.5.6. Наблюдаемые изменения не повлияли на антигенные характеристики, крысиные и хорьковые антисыворотки к референс-штамму нейтрализуют современные вирусы в пределах 1 и 1/2 гомологичного титра.

По результатам генетического и антигенного анализов вирусов гриппа В сезонов 2023-2024 гг. и 2024 -2025 гг. можно сделать вывод о соответствии циркулирующих вирусов вакцинному штамму В/Австрия/1359417/21.

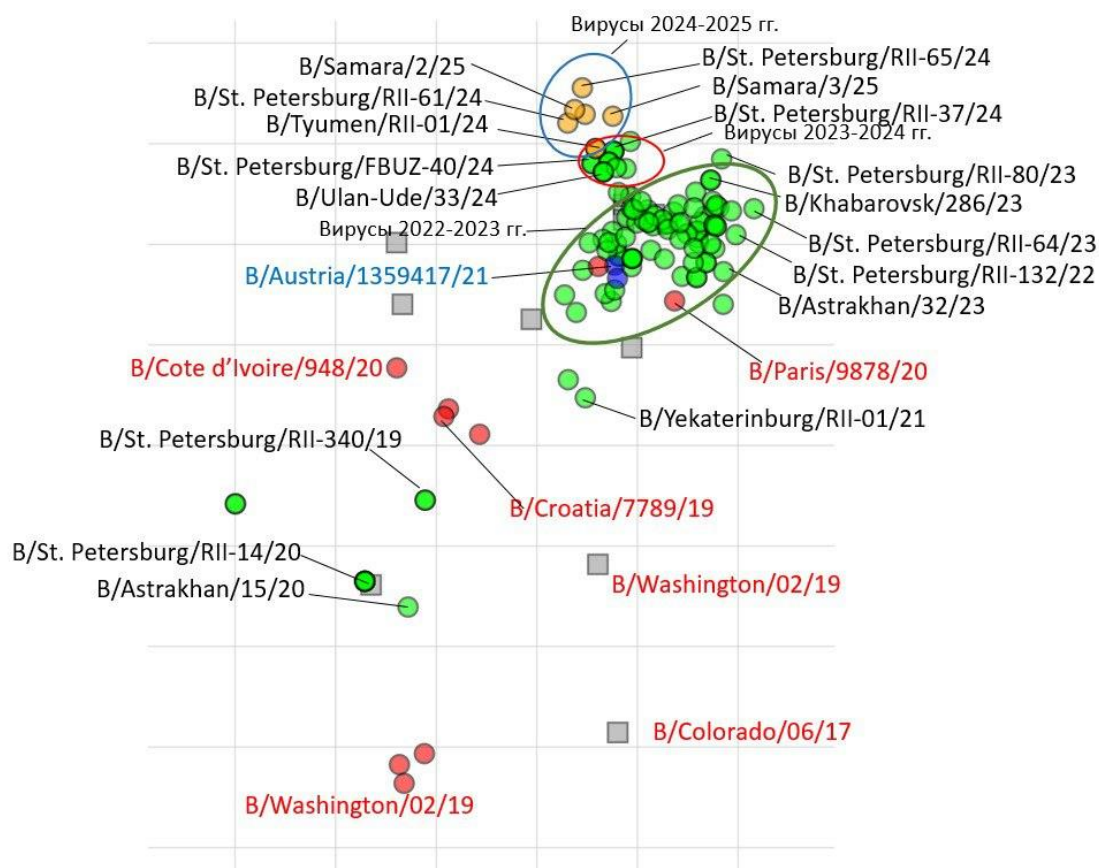


Рисунок 1 – Антигенная карта вирусов гриппа В викторианской линии, выделенных на территории России в эпидемических сезонах 2023-2024 гг. и 2024-2025 гг.

Обозначения: Красные кружки – референс-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 крысинные антисыворотки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ВЫСОКОПАТОГЕННОМУ ГРИППУ ПТИЦ В ПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Бровко Ю.В.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Тула, Россия

Целью данной работы является оценка эффективности практического применения молока как объекта исследований при мониторинге с целью выявления антител к вирусу

высокопатогенного гриппа птиц (ВПГ) в популяции крупного рогатого скота на территории РФ. В Российской Федерации не зарегистрированы случаи заболевания КРС, вызванного вирусом высокопатогенного гриппа птиц H5N1. Однако, всегда существует вероятность заноса возбудителя. Основанием для проведения настоящего исследования послужили сообщения о заболевании гриппом крупного рогатого скота в 957 стадах в 16 штатах США, вызванном ВПГ подтипа H5N1 клада 2.3.4.4в генотипа В3.13. Молочный скот может выделять вирус в молоко и потенциально передавать инфекцию другим млекопитающим через непастеризованное молоко и молочные продукты.

Поиск специфических антител в молоке является одним из видов диагностики вирусных болезней и позволяет выявить активную циркуляцию вируса в популяции. Оценка применения молока как альтернативного объекта исследований в классических серологических реакциях (метод РТГА) была проведена на примере парагриппа-3 и показала хорошие результаты по выявлению антител к указанному возбудителю. Пробы молока также могут использоваться для поиска гемагглютинирующих антител к ВПГ методом РТГА. Использование молока в качестве неинвазивного биологического материала позволяет с минимальными затратами определить эпизоотологический (серопозитивный) статус по гриппу как конкретного животного, так и исследуемого поголовья в случае исследования пула, сборной пробы молока.

Исследования проводились на базе Тульской испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» начиная с июля 2024 года и продолжаются по настоящее время.

Для работы был использован коммерческий набор производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации».

Подготовку образцов молока к тестированию проводили двумя способами:

1 способ: обезжиривали молоко центрифугированием при 3000-5000 об/мин в течение 30 минут, образцы отбирали из-под слоя жира.

2 способ: при помощи пепсина проводили обработку молока из расчета на 100 мл молока 1,0-1,5 мг сухого пепсина, после перемешивания инкубировали при 37°C 30-60 минут и центрифугировали при 1000-3000 об/мин в течении 10 минут, отбирали образцы полученной молочной сыворотки.

Постановка реакции с подготовленными пробами молока проводилась аналогично пробам сыворотки крови, в соответствии с инструкцией к набору.

В период с 01.07.2024 по 31.12.2024 в лабораторию поступило 852 пробы молока из 22 регионов РФ: из 692 поступивших проб сырого молока исследовано 426 образцов, что составило 62% охвата; из 160 проб пастеризованного молока исследовано 74 образца, что составило 46% охвата.

В исследованных методом РТГА образцах коровьего молока антител к ВПГ не выявлено. По результатам исследования можно предположить отсутствие циркуляции вируса ВПГ подтипа H5N1 среди исследуемого поголовья.

В связи с участвовавшими случаями выявления ВПГ среди КРС в других странах, необходимо усилить контролирующие мероприятия с целью максимально быстрого выявления признаков изменения эпизоотической ситуации по данному заболеванию на территории Российской Федерации. Применяемый метод наилучшим образом подходит для данной задачи в связи с простотой отбора образцов и быстротой постановки реакции, а также увеличенным охватом поголовья КРС.

В настоящее время работы в данном направлении продолжаются. Планируется увеличить охват образцов для исследований до 95-100 % проб, поступающих в лабораторию, так же провести дополнительные валидационные эксперименты по выявлению антител ВПГ методом РТГА в молоке коров.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ В-ЛИМФОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ПРИ COVID-19 И В ПОСТКОВИДНОМ СИНДРОМЕ

Бутенко А.А.^{1,2}, Коробова З.Р.¹

¹*Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия*

²*Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия*

Постковидный синдром (синдром «лонг-ковида», long COVID) представляет собой сложное состояние, сохраняющееся в течение трех месяцев после первичной инфекции и сопровождающееся разнообразными симптомами, включая усталость, когнитивную дисфункцию и одышку. Исследования указывают на возможную связь этого состояния с иммунной дисрегуляцией, что подчеркивает необходимость изучения изменений звеньев иммунитета. Известно, что основной вклад в противовирусный иммунный ответ вносят Т-лимфоциты, однако значительную роль играет и В-клеточное звено. Цитокины, а также малые субпопуляции В-лимфоцитов, могут участвовать в патогенезе осложненного течения COVID-19.

Материалы и методы: В исследование включены 63 человека с диагностированным long COVID. Диагноз подтвержден на основе когнитивных, психоневрологических и соматических симптомов, наблюдающихся более 12 недель. В группу контроля вошли 47 условно-здоровых доноров. Уровень антиген-специфических антител: IgG к N-белку и RBD SARS-CoV-2 оценивали методом ИФА. Субпопуляции В-клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием антител к IgD, CD38, CD5, CD27, CD19 и CD45. Классификацию В-клеток проводили по схемам «Bm1-Bm5» и CD27/CD38. Концентрацию Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) определяли методом мультиплексного анализа xMAP. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism 8, SPSS Statistics.

Результаты: В ходе исследования не было выявлено статистических различий между группами по уровню циркулирующих антител IgG против белков SARS-CoV-2, что указывает на сохраняющийся иммунитет против данной инфекции. Статистически значимых различий в общем количестве CD45+CD19+ В-лимфоцитов в крови исследуемых групп не обнаружено. Однако было отмечено изменение в субпопуляциях В-лимфоцитов: снижение Bm2' и Bm3-4 и увеличение Bm5 и eBm5 у пациентов с long COVID. Подобные изменения представлены в литературе в отношении острой фазы инфекции. При анализе функциональных субпопуляций В-клеток по маркерам CD27 и CD38 выявлено статистически значимое увеличение наивных зрелых клеток (CD27-CD38+), при одновременном снижении переходных (CD27-CD38+++) и двойных негативных (CD27-CD38-) клеток. Это может свидетельствовать о нарушении процесса созревания В-клеток и их участия в иммунном

ответе. Исследование цитокинового профиля показало повышение уровней IL-5 и IL-13 у пациентов с long COVID, тогда как концентрации IL-4 не различались между группами. Это подтверждает наличие сдвига в сторону Th2-опосредованного воспаления. Метод классификационного анализа (QUEST) выявил, что наиболее значимым маркером для прогноза long COVID является уровень переходных CD27-CD38+++ В-клеток. Их снижение (<5,94%) ассоциировано с длительным течением заболевания. Этот результат подтверждает гипотезу о связи long COVID с аутоиммунными процессами, сопровождающими нейрокогнитивную дисфункцию.

Выводы: Исследование выявило значимые изменения в субпопуляциях В-клеток у пациентов с long COVID, включая снижение Bm2' и Bm3+4, а также уменьшение количества переходных В-клеток, что может способствовать развитию аутоиммунных процессов. Наблюдалось закономерное увеличение эффекторных зрелых клеток (eBM5), вырабатывающих антитела. Уровни цитокинов Th2-типа были повышены, но их значения требуют дальнейшего изучения. Полученные данные свидетельствуют о комплексной роли В-клеток в иммунных реакциях при long COVID, что указывает на необходимость дальнейших исследований иммунной системы у пациентов с данной патологией с целью усовершенствования диагностики.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЕЙ АНТИНЕЙРАМИНИДАЗНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ГРИППА ТИПА В ОБЕИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

***Вон П.Ф., Степанова Е.А., Баженова Е.А., Дешева Ю.А., Кударь П.А., Шведова Т.Н.,
Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.***

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Антитела, нацеленные на нейраминидазу (NA) — второй по распространенности поверхностный белок вируса гриппа — играют ключевую роль в обеспечении защиты от гриппа. Современные вакцинные стратегии против гриппа сосредоточены на выработке антительного ответа против молекулы гемагглютинина (HA), однако в последнее время растет интерес к NA как к мишени для разработки вакцин. Важным инструментом при разработке вакцин, направленных на NA, является валидированный серологический тест для количественного определения анти-NA антител. В настоящее время наиболее распространенной и широко используемой методикой для оценки нейраминидаза-ингибирующих (NI) антител является лектин-ферментный анализ (ELLA). В этом анализе NA расщепляет терминовые сиаловые кислоты с гликопротеинового субстрата — фетуина, высвобождая предпоследний сахар — галактозу. Степень десиалирования количественно определяется с использованием конъюгата арахисового агглютинина (PNA) с пероксидазой хрена, который специфически связывается с галактозой. Затем добавляют хромогенный субстрат пероксидазы, а измеренная оптическая плотность прямо пропорциональна активности NA. Важным аспектом тестов, измеряющих титры NI антител, является источник NA, поскольку иммунные сыворотки обычно содержат антитела к HA. Чтобы избежать

неспецифического ингибирования антителами к НА, в анализе следует использовать очищенную НА или вирусы, содержащие НА от нерелевантных вирусов гриппа.

Целью данного исследования было создание двух диагностических вирусов гриппа для измерения NI-антител к вирусам гриппа В линий Виктория и Ямагата. Для этого были реконструированы два генно-инженерных вируса гриппа А на основе аттенуированного штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), содержащие химерные НА, состоящие из нетранслируемых участков (UTR) Лен/17 НА и эктодомена вирусов В/Brisbane/60/2008 и В/Phuket/3037/13 (Рисунок 1).

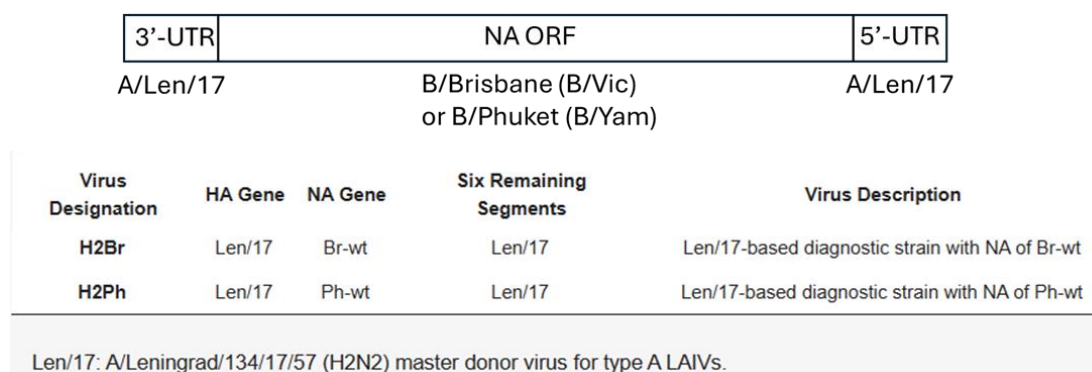


Рисунок 1 – Дизайн химерных конструкций НА. Мономеры H2Br и H2Ph НА. Два диагностических штамма, созданные на основе Лен/17, были реконструированы путем замены эктодомена НА вируса гриппа А на эктодомен НА вирусов гриппа В обеих линий.

Возможность использования вновь созданных диагностических штаммов для оценки НА-ингибирующих антител была продемонстрирована в эксперименте на мышах, а также при анализе сывороток, собранных у здоровых добровольцев из Санкт-Петербурга и Ленинградской области в рамках рутинного мониторинга популяционного иммунитета к различным вирусам гриппа.

В эксперименте на мышах самкам C57BL/6J вводили интраназально две дозы живых аттенуированных вакцинных вирусов (ЖГВ) на основе В/60: В/Brisbane/08/83 (линия Виктория) или В/Phuket/3037/13 (линия Ямагата). NI-антитела оценивали в сыворотке мышей через три недели после второй дозы вакцины. Обе вакцины индуцировали высокий уровень NI-антител, однако эти антитела демонстрировали минимальную перекрестную реактивность, что подчеркивает актуальность разработки новых вакцин против гриппа В, направленных на НА и обладающих перекрестной активностью.

Анализ сывороток человека выявил низкий уровень NI-антител к вирусу линии В/Victoria, тогда как уровень НА-ингибирующих антител к вирусу линии В/Yamagata оказался довольно высоким. Это указывает на то, что жители Санкт-Петербурга и Ленинградской области разного возраста имеют достаточный уровень популяционного иммунитета для защиты от вирусов линии В/Yamagata. Кроме того, NI-антитела к вирусам линии В/Yamagata могли также сыграть роль в исчезновении этой линии из циркуляции.

Данное исследование финансировалось за счет бюджетных средств ФГБНУ «ИЭМ», проект FGWG-2023-0005.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ОСТРОВА САХАЛИН В 2022-2024 ГГ.

*Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Козлов А.А., Никонова З.Б.,
Овчинникова Е.В., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.*

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Цель. Описать генетические свойства изолятов вируса гриппа птиц, выявленных на территории острова Сахалин в период с 2022 по 2024 годы.

Материалы и методы. Идентификацию и подтипирование вируса гриппа птиц (ВГП) в пробах патологического материала (внутренние органы) проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Фрагменты гена НА секвенировали методом Сэнгера. Полногеномное секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina). Анализ нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева проводили с использованием программ BioEdit и MEGA7.

Результаты и обсуждение. В период с 2022 по 2024 гг. на острове Сахалин ежегодно выявляли ВГП подтипа H5N1 – у сельскохозяйственных кур на территории птицефабрики (в 2022 и 2024 гг.) и среди диких водоплавающих птиц, а также у морского котика (2023 г.).

После проведения сравнительного генетического анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена НА (820-1077 н.о. ОРС) установили, что все изоляты, выделенные на о. Сахалин, принадлежат к азиатской генетической линии вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5 (Gs/Gd/96) клады 2.3.4.4b (рис.), которая к настоящему моменту получила широкое распространение по всему миру (в странах Европы, Азии, Северной и Южной Америки, Африки, на территории Антарктики). Аминокислотная последовательность сайта протеолитического расщепления гемагглютинина исследованных изолятов имеет структуру PLREKRRKR/GLF, за исключением изолята A/chicken/Sakhalin/2550-3/2022 - PLRERRRKR/GLF, характерную для высоковирулентных вирусов гриппа птиц.

Согласно данным международных баз GISAID (EpiFlu) и GenBank, наиболее генетически близкими по фрагменту гена НА к исследуемым изолятам с острова Сахалин являются вирусы гриппа птиц, выявленные у домашних и диких птиц на территории стран Европы в 2021-2022 гг. (подтипы H5N1 и H5N8), Китая в 2020-2023 гг. (подтипов H5N8, H5N1 и H5N6), Японии и США в 2022-2024 гг. (подтип H5N1) с уровнем сходства до 99-100%.

В результате анализа полногеномной последовательности изолятов от морского котика (A/seal/Sakhalin/2050-1/2023) и от кур (A/poultry/Sakhalin/344-1/2024, A/poultry/Sakhalin/436-3/2024) на наличие основных маркерных аминокислот, указывающих на адаптацию вируса к хозяевам-млекопитающим, выявлено присутствие замен, вызывающих увеличение репликации вируса у мышей (N66S в белке PB1-F2) и повышение вирулентности у мышей и хорьков (N30D, T215A в белке M1; P42S, L103F, I106M, V205S, аминокислотный мотив ²²⁷ESEV²³⁰ в белке NS1). Не отмечено наличие мутаций, увеличивающих полимеразную активность вируса (в PB2, PB1) или отвечающих за сродство к рецепторам SA α -2,6, характерное для вирусов гриппа млекопитающих (в НА).

Заключение. Выявленные на территории о. Сахалин вирусы гриппа птиц демонстрируют высокую степень схожести по структуре последовательности фрагмента гена

НА как между собой (уровень сходства 99,2-100%), так и с изолятами из других стран, выявляемыми с 2020 года, что указывает на межконтинентальное распространение ВГП подтипа Н5 клады 2.3.4.4b дикими водоплавающими птицами во время сезонных миграций.

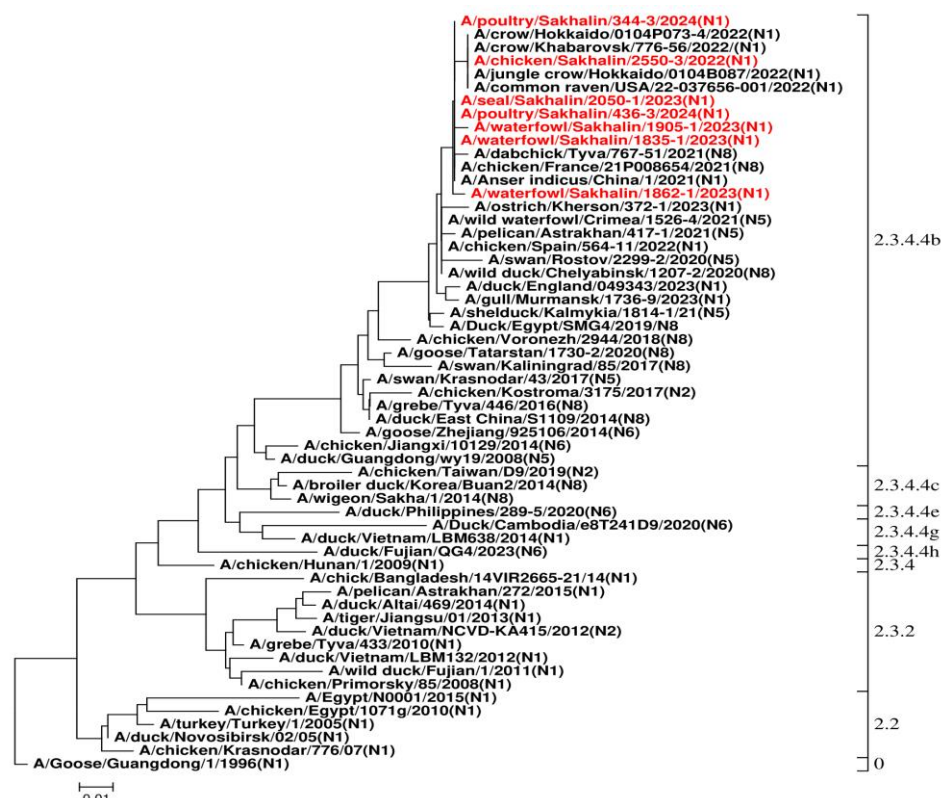


Рисунок – Филогенетическое древо, построенное по алгоритму NJ по фрагменту (820-1077 н.о. ОРС) гена НА

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

*Гузенков Д.С., Соколовский Д.Д., Рекстин А.Р., Гупалова Т.В.,
Бормотова Е.А., Кударь П.А., Дешева Ю.А.*

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Грипп продолжает оставаться одной из самых значимых проблем в современной медицине и здравоохранении. Каждый год он становится причиной эпидемий и пандемий, приводящих к высокому уровню заболеваемости и смертности среди людей. Несмотря на активное применение вакцин, их эффективность часто оказывается недостаточной из-за постоянной мутации вируса гриппа. Это вынуждает регулярно обновлять штаммовый состав вакцин. В связи с этим поиск новых методов разработки вакцин, способных обеспечивать защиту от различных штаммов вируса, становится крайне важной задачей. Белок Нейраминидаза (NA) вируса гриппа является перспективной целью для разработки универсальных вакцин против гриппа. Этот белок играет важную роль в

жизненном цикле вируса и имеет более высокую степень структурной и функциональной консервативности среди различных штаммов сравнению с гемагглютинином (НА).

Методы. Для получения рекомбинантного белка НА использовали плазмидную ДНК pENTF-na, полученную при разработке живой пробиотической вакцины для профилактики инфекции, вызванной вирусом гриппа [1]. Рекомбинантную НА подтипа N2 использовали в качестве антигена для сенсibilизации 96-луночных панелей в концентрации 2 и 5 мкг/мл при постановке иммуноферментного анализа (ИФА) с поликлональными сыворотками человека, содержащими НА-ингибирующие антитела к нейраминидазе N1 и не содержащими антител к N2.

Фрагменты ДНК, соответствующие гену НА, кодирующему последовательность НА из 208 аминокислот, были встроены в рекомбинантную ДНК-плазмиду для экспрессии в пиях пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3. Мыши линии СВА трехкратно получали в виде корма культуру *E. faecium* L 3 со вставкой НА и без нее.

Мышей линии СВА (по 10 в группе) иммунизировали внутримышечно рекомбинантной НА с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma, США) в соотношении 1:1 дважды с интервалом в 2 недели; животным в контрольной группе вводили фосфатный буферный раствор (ФБ) по той же схеме. Образцы крови были получены через 2 недели после 1-й и 2-й иммунизации. Для выявления вирус-специфических IgG ИФА проводили с обработанными RDE (Denka Seiken, Япония) сыворотками крови с использованием в качестве антигена цельного очищенного вируса A/17/Южная Африка/2013/01(H1N1)pdm09.

Статистические различия проверяли с помощью непараметрической статистики, различия считались значимыми при $P < 0,05$.

Результаты. Показано, что рекомбинантная НА проявляла перекрестно-реактивные свойства в реакции ИФА с поликлональными сыворотками человека.

Пероральное введение мышам модифицированного НА энтерококка вызывало формирование сывороточных IgG, специфичных к вирусам A/H1N1pdm09, A/H3N2 и A/H2N2.

В группе мышей, иммунизированных рекомбинантной НА, средние уровни IgG к вирусу A/17/Южная Африка/2013/01(H1N1)pdm09 в сыворотках крови после первой и после второй иммунизаций были значительно выше, чем в контрольной группе ($P < 0,01$).

Заключение. Таким образом, рекомбинантная НА подтипа N2 проявляла кросс-реактивность с поликлональными антителами к N1 и вызывала у мышей продукцию вирус-специфических антител к гетерологичному вирусу гриппа A/17/Южная Африка/2013/01(H1N1)pdm09. Культура *E. faecium* L 3 со вставкой НА вызывала продукцию вирус-специфических антител к вирусам A/H1N1pdm09, A/H3N2 и A/H2N2. Исследование рекомбинантной НА, как прототипа универсальной гриппозной вакцины, будет продолжено.

Работа выполнена в рамках государственного задания, тема НИР: FGWG-2023-0005.

СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ О БИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6 ТИПА И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМ КЛИНИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Дроздовская П.А.^{1,2}, Цинзерлинг В.А.^{1,2,3}

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

³Клиническая инфекционная больница имени С. П. Боткина, г. Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. До 95% общей популяции серопозитивны к вирусу герпеса 6 типа (HHV-6). Вопреки всеобщей инфицированности, в клинической практике HHV-6-инфекции остаются малопонятными. Патогенетические особенности HHV-6 определяют разнообразие клинических проявлений, трудности постановки диагноза и выбора тактики лечения.

Цель исследования. Анализ актуальной информации о биологических особенностях HHV-6, ассоциированных с ним клинических состояниях, патогенезе и диагностике инфекции.

Материалы и методы. Обзор современной литературы в базе данных *Pubmed*, *ScienceDirect*, *eLibrary* по изучаемым вопросам.

Результаты. HHV-6 относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*; представлен видами HHV-6A и HHV-6B. Пик заболеваемости - весна и осень. Пути передачи: воздушно-капельный, искусственный (реципиенты костного мозга и стволовых клеток), вертикальный (генетический материал, через плаценту). Продолжительность инкубационного периода зависит от пути заражения и клинических форм (в среднем - 1-2 недели). Врожденная HHV-6-инфекция выявляется у 1% новорожденных, чаще заражение происходит после 6 месяца жизни. К 2 годам жизни антитела против HHV-6 имеют 77% детей, к 5 годам - более 88%.

Большинство людей переносят HHV-6-инфекцию бессимптомно. Манифестное течение наблюдается у 34-49% впервые инфицированных детей, и у иммунокомпрометированных взрослых (больные СПИДом, онкобольные, реципиенты стволовых клеток) в результате реактивации хронической инфекции. находятся в группе риска развития тяжелых клинических форм, нередко заканчивающихся инвалидизацией или летальным исходом.

Доказана этиологическая роль HHV-6 в развитии многоформной экссудативной эритемы, внезапной экзантемы, менингита, энцефалита, посттрансплантационного миелита, гепатита, интерстициальной пневмонии и моноклеозоподобного синдрома. Обсуждается возможное влияние реактивации латентной инфекции для манифестации височной эпилепсии, болезни Альцгеймера и ряда аутоиммунных заболеваний.

Комплементарным рецептором для адгезии HHV-6A является CD46, HHV-6B использует CD134. Вирус обнаруживается в клетках ЦНС, миндалин, слюнных желез, почек, печени, лимфатических узлов, эндотелия и внутри макрофагов (моноцитов) и дендритных клетках. Наибольший тропизм HHV-6 проявляет к активированным CD4+ Т-лимфоцитам. Внутри лимфоцитов и моноцитов вирус активно размножается, перемещаясь по организму с током крови. Во время первичного инфицирования вирионы оседают и активно реплицируются в клетках слюнных желез. Проникая через ГЭБ, HHV-6 поражает гиппокамп, что клинически проявляется фебрильными судорогами. Внутриклеточное размножение

HHV-6 происходит аналогично размножению других герпесвирусов. Уникальной особенностью *HHV-6* является способность к интеграции ДНК *HHV-6* в субтелометрическую зону клеточных хромосом клетки хозяина. Интегрированный вирус (*ciHHV-6*) неопределённо долго находится в латентном состоянии и может быть передан реципиентам препаратов крови и стволовых клеток, а также потомству вместе с хромосомной ДНК. Патогномоничные морфологические признаки для *HHV-6*-инфекций не описаны.

В клинической практике для диагностики *HHV-6* используется количественная оценка вирусной ДНК в биологическом материале посредством *real-time PCR*. До сих пор формально не установлено количество копий, разграничивающее латентные и активные *HHV-6*-инфекции. Условно определено значение 1000 копий ДНК *HHV-6* на мл цельной крови. Трудности возникают при установлении диагноза у пациентов, являющихся носителями *ciHHV-6*: число копий ДНК *HHV-6* может превышать десятки тысяч при фактическом латентном бессимптомном течении инфекции. Серологические методы используются ограничено из-за малой специфичности.

Против активных *HHV-6*-инфекций эффективны ганцикловир, фоскарнет и цидофовир. Стандарты лечения не разработаны.

Выводы. За последние 10 лет представление о *HHV-6* значительно прояснилось. Доказана этиологическая роль вируса в развитии многих клинических состояний. Стали понятны основные звенья патогенеза *HHV-6*-инфекции, способы персистирования вируса и последствия реактивации латентной инфекции. Неизвестны причины развития конкретной клинической формы и степени тяжести её течения. Имеется ряд неразрешимых трудностей при диагностике и лечении.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПРОИЗВОДНЫХ ПУРИНА И КАМФОРЫ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Есаулкова Я.Л.¹, Чернышов В.В.², Соколова А.С.², Чулаков Е.Н.³, Яровая О.И.²,
Краснов В.П.³, Зарубаев В.В.¹

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³Институт органического синтеза им. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Исследование проводилось с целью поиска новых кандидатов для лечения респираторных инфекций человека, вызванных вирусами, среди новых производных камфоры и производных пурина.

Для изучения биологической активности новых химических соединений в работе использовались клетки культур MDCK, A549, MA-104 и вирусы гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/07/09 ((H1N1)pdm09), A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2), B/Florida/4/2006 (Yamagata lineage), B/Malaysia/2506/2004 (Victoria lineage), вирус парагриппа 3 типа, респираторно-

синцитиальный вирус типа А, и аденовирус 5 типа (VR5). Методами работы являлись: МТТ-тест, реакция гемагглютинации, гемолиз-тест, оценка активности нейраминидазы при помощи люминесцентного субстрата (MUNANA).

В ходе исследования была проведена оценка цитотоксических и противовирусных свойств 141 соединения против вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34. Из них 105 соединений не обладали токсическими свойствами в отношении клеток. Противогриппозная активность была обнаружена у 66 соединений. Высокая селективность была выявлена у 37 соединений. Для углубленных исследований из библиотеки химических соединений отобрали 8. Из них производными камфоры являлись соединения 1-5, а производными пурина – 6-8.

Соединения 7 и 8 обладали противовирусной активностью против широкого спектра вирусов гриппа, так как их индексы селективности (SI) против штаммов гриппа A/Anhui/1/2013, A/Aichi/2/68, A/California/07/09, A/mallard/Pennsylvania/1984, B/Malaysia/2506/2004 превышали 10, что говорит об их высокой активности против этих вирусов при нетоксичных концентрациях соединений. Против остальных исследованных вирусов эти соединения не показали значимой селективности. Соединение 1 было активно против A/Aichi/2/68 (SI=95) и A/mallard/Pennsylvania/1984 (SI=17), соединение 2 – против B/Florida/4/2006 (SI=21), соединение 4 – против A/Aichi/2/68 (SI=19), соединение 6 – против B/Florida/4/2006 (SI=10) и B/Malaysia/2506/2004 (SI=18), соединение 5 – против вируса парагриппа (SI=20).

Для расшифровки механизма действия активных против вируса гриппа соединений их инкубировали с зараженными клеткам на разных временных промежутках, соответствующих разным этапам жизненного цикла вируса. Было показано, что соединения 1-4 ингибируют активность вируса при добавлении на этапе связывания вирусом клеточного рецептора и проникновения вируса в клетку, когда задействованы вирусные белки гемагглютинин (НА) и ионный канал М2. Соединения 5-8 были активны против вируса гриппа вплоть до последней стадии его репликативного цикла, когда идёт сборка новых вирионов и их выход из клетки при участии вирусного белка нейраминидазы (NA).

В присутствии соединений 1-4 гемолизирующая активность вируса гриппа, обусловленная слиянием мембран вируса и эритроцитов, снижалась в 2 раза и более. Исходя из этого, вероятно, что эти соединения воздействуют на участок НА вируса гриппа, отвечающий за слияние мембран вируса и клетки, пептид слияния.

В тесте на определение активности соединений 5-8 против NA вируса гриппа была показана высокая активность соединений 6 и 8 против NA, их 50% ингибирующая концентрация составила 26 и 18 мкг/мл соответственно.

Таким образом, была исследована противовирусная активность библиотеки соединений, выявлены соединения-лидеры, определён спектр их активности против вирусов респираторной системы человека и выявлены вероятные белковые мишени этих соединений. Для подтверждения механизмов действия соединений требуются дальнейшие исследования.

ВНЕДРЕНИЕ ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В РОССИИ В РАМКАХ ИНИЦИАТИВЫ ARBOVIRUS RESEARCHERS UNITE (ARU)

***Желтухина А.И.¹, Иванова А.А.¹, Венёв Е.В.², Ёлиин Н.Д.¹, Фадеев А.В.¹,
Комиссаров А.Б.¹***

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, г. Санкт-Петербург, Россия

Лихорадка Денге (DENV) является одной из наиболее распространенных трансмиссивных инфекций в мире. По официальным данным Европейского регионального бюро ВОЗ, в 2024 году в мире зарегистрировано более 14 миллионов случаев лихорадки Денге и более 10 000 случаев смерти, связанных с этим заболеванием. Хотя лихорадка Денге не является эндемичной для территории России, выявляемые случаи заболевания часто выявляются среди населения – так, за 2024 год в России было зарегистрировано суммарно 282 случая заболеваний лихорадкой Денге, при этом за этот же период выявлено 42 случая инфекции Крымской геморрагической лихорадки, для которой известны природные очаги на территории России. В этой связи важно обеспечивать готовность к ранней детекции возбудителей лихорадки Денге и других арбовирусных инфекций, которые не выявляются на территории Российской Федерации, но вероятность завоза которых возрастает в связи с интенсификацией циркуляции возбудителей в мире и миграцией населения. С августа 2023 года действует инициатива Arboviruses Researchers Unite (ARU), целью которой является расширение геномного надзора и обмен данными об арбовирусах через платформу EpiArbo GISAIID. Эта платформа в настоящее время сосредоточена на вирусах желтой лихорадки, Денге, Чикунгунья, Зика и Оропуш, которые представляют особую опасность для людей в глобальном масштабе из-за повторяющихся крупных и расширяющихся эпидемических вспышек. Целью нашего исследования было внедрение полногеномного секвенирования вируса Денге.

В рамках деятельности Референс-центра по мониторингу биологических угроз на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России было получено 14 образцов инаktivированного биоматериала из Санкт-Петербурга и Республики Коми от пациентов как с подозрением на лихорадку Денге, так и с подтвержденными случаями данной инфекции. Все пациенты прибыли из стран Юго-Восточной и Южной Азии (Таиланд, Индонезия, Мальдивы). В крови 9 пациентов методом ПЦР в реальном времени был обнаружен вирус Денге. Для подтвержденных образцов проводилась полногеномная амплификация с использованием панелей праймеров 1000 п.н. лаборатории Grubaugh и набора Биомастер ОТ-ПЦР-Премиум(2х) и адаптированного протокола DengueSeq. Секвенирование возбудителей проводилось на платформах Oxford Nanopore GridION, Illumina Nextseq 2000 и MGI Tech DNBSEQ-G400. По результатам полногеномного секвенирования определено, что 7 вирусов относятся к подтипу 2, еще два – к подтипу 3. Оба подтипа широко распространены в указанных регионах.

Таким образом, нами был успешно внедрен протокол секвенирования всего генома для типов DENV 2 и 3 из завозных случаев лихорадки Денге на северо-западе России. Поскольку лихорадка Денге регулярно завозится в Россию из Юго-Восточной Азии,

необходимы регулярный молекулярный надзор и быстрый обмен данными с международным сообществом для характеристики штаммов, отслеживания эволюции вируса, совершенствования средств диагностики и профилактики, а также для повышения уровня готовности реагирования на новые возникающие биологические угрозы, связанные с арбовирусными инфекциями.

ВЛИЯНИЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА БИОДОСТУПНОСТЬ МУКОЗАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Загрядский Н.С., Шамакова Д.А., Сергеева М.В., Стукова М.А.

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

На сегодняшний день остается актуальным вопрос создания мукозальной вакцины с широким спектром защитной эффективности в отношении сезонных и потенциально пандемических вирусов гриппа. Обладая рядом преимуществ (формирование иммунного ответа во входных воротах инфекции, неинвазивный способ введения, простота применения), мукозальные вакцины зачастую демонстрируют относительно невысокую биодоступность. Это вынуждает разработчиков повышать дозу вводимого препарата, что приводит к увеличению расходов на его производство.

Одним из путей увеличения биодоступности является включение в состав готовой лекарственной формы (ГЛФ) вакцины мукоадгезивных соединений, которые увеличивают время пребывания препарата в носовой полости, продлевая контакт клеток слизистой оболочки и вакцинного вируса. В данной работе проводили оценку влияния альгината натрия (AlgNa) на биодоступность кандидатной гриппозной вакцины при интраназальном введении животным.

В качестве тестового препарата использовали один из компонентов вакцины - штамм вируса гриппа В с укороченным белком NS1. Оценка иммуногенности проводили на белых беспородных мышах BALB/c и морских свинках. Иммунизацию мышей (по 12 животных в группе) проводили интраназально (и.н.) в дозе 6 lg ЭИД₅₀/животное в объеме 10 мкл; иммунизацию морских свинок (по 4 животных в группе) проводили и.н. в дозе 4,9 lg ЭИД₅₀/животное в объеме 20 мкл. Животные в экспериментальных группах получали вакцинный вирус в композиции с AlgNa (до 1% по массе) в буфере SPGN, животные в контрольной группе - вирус в буфере SPGN без AlgNa. На 21-й день после иммунизации у всех животных производили забор крови для постановки РТГА; у морских свинок дополнительно отбирали носовые смывы для постановки ИФА.

Отсутствие негативного влияния AlgNa на инфекционную активность вакцинного вируса было показано *in vitro* при титровании в культуре клеток MDCK.

В исследованиях на животных показано, что включение AlgNa в состав тестируемого образца приводило к увеличению выработки анти-гемагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей на 21-й день после иммунизации. Среднее геометрическое титра (СТТ) антител в группе AlgNa составило 1:215, доля ответивших животных составила 100%.

При этом СГТ антител в контрольной группе составило 1:45, доля ответивших животных составила 66,7%.

У морских свинок отмечено трехкратное увеличение уровня антител в образцах носовых смывов в группе животных, иммунизированных препаратом с AlgNa, по сравнению с группой контроля. Достоверной разницы в уровнях анти-гемагглютинирующих антител в сыворотках крови морских свинок отмечено не было.

Полученные результаты демонстрируют целесообразность включения AlgNa в состав противогриппозной вакцины с интраназальным способом введения.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В РОССИИ В 2017-2024 ГОДАХ

*Иванов Я.В., Фадеев А.В., Сукайло Д.А., Петрова П.А., Передерий А.А., Писарева М.М.,
Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б.*

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

Метапневмовирус человека (Human metapneumovirus, hMPV) имеет большое эпидемиологическое значение, являясь одной из основных причин инфекций нижних дыхательных путей у детей младше 2 лет и лиц старше 65 лет. Возможно многократное инфицирование hMPV в течение жизни человека, ввиду антигенной и генетической изменчивости возбудителя, что затрудняет формирование стойкого иммунитета. Метапневмовирус человека классифицируется на две основные генетические линии – А и В, которые дополнительно подразделяются на соответствующие сублинии А1, А2, В1 и В2. Геном hMPV, длина которого составляет около 13 000 нуклеотидов, состоит из 8 генов, кодирующих 9 белков. Среди них ключевую роль играют два поверхностных гликопротеина, обеспечивающих проникновение вируса в клетки хозяина: белок слияния (F) и белок прикрепления (G). G-белок опосредует прикрепление вируса к клеточной поверхности, а F-белок отвечает за процессы слияния мембран. Несмотря на то, что hMPV известен более 20 лет, его генетическое разнообразие охарактеризовано недостаточно как в мире, так и в России. Изучение эволюционных связей и генетических особенностей hMPV является важным для понимания механизмов патогенности и разработки эффективных методов профилактики и лечения.

Целью данного исследования являлась апробация протокола полногеномного секвенирования hMPV для оценки генетического разнообразия метапневмовирусов, циркулирующих в отдельных субъектах России. Материалами исследования были назофарингеальные мазки от госпитализированных пациентов с симптомами ОРВИ, положительные в ПЦР на hMPV. Из части этих образцов на клеточной культуре LLC-MK2 был выделен вирус hMPV. На платформе Illumina MiSeq было проведено полногеномное секвенирование вирусов hMPV из мазков и изолятов с последующим филогенетическим анализом.

По данным ПЦР-диагностики, проведенной в рамках госпитального надзора на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области в течение эпидемических сезонов

2017–2024 гг., было показано, что частота встречаемости метапневмовируса составляла в среднем 9,7% от всех положительных на вирусные патогены случаев, исключая возбудители гриппа и COVID-19, и варьировала в различные эпидемические сезоны. Доля положительных случаев метапневмовирусной инфекции была относительно высокой только в сезон 2020–2021 гг. и составила 21,4%. В следующем сезоне 2021–2022 гг. вклад hMPV был минимальным (2,5%). Впервые в России нами было проведено полногеномное секвенирование 44 hMPV, циркулировавших в период с 2017 по 2024 г. По результатам исследования была описана их принадлежность к генетическим группам, показано доминирование генетического клайда A2b2. Проведенный филогенетический анализ показал высокую степень сходства между российскими изолятами hMPV и изолятами, циркулирующими в Европе и Азии, что подчеркивает важность трансграничного эпидемиологического мониторинга. Подтверждено, что наибольшее разнообразие в генах, кодирующих поверхностные белки вируса, отмечено для гена G, в то время как в гене F в изучаемый период изменения были минимальны. Наличие дупликаций в гене G, выявленных у большинства российских изолятов, указывает на возможное формирование новых антигенных вариантов, которые могут иметь эпидемиологическое значение. Эти изменения требуют дальнейшего изучения, поскольку они потенциально могут повлиять на эффективность вакцинных препаратов. Изучение генетической изменчивости hMPV имеет решающее значение для понимания вирусной эволюции, динамики передачи и механизмов иммунного ускользания, которые влияют на разработку вакцин и противовирусных препаратов.

ВОПРОСЫ ВЫБОРА БИОБРАЗЦОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА

*Иголкина А.А.¹, Черкасова П.В.¹, Маркин И.В.¹, Голева О.В.¹, Чухловин А.Б.², Базиян Е.В.¹,
Эйсмонт Ю.А.¹, Рогозина Н.В.¹, Васильев В.В.¹, Глотов О.С.¹*

¹*Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург, Россия*

²*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Генотипирование является важным инструментом для определения генетических особенностей вируса. Данные особенности могут отличать вирусы одного вида по патогенности, вирулентности и реакции на специфическое лечение. Некоторые вирусы обладают высокой полиморфностью, что создает сложности в определении универсального метода генотипирования. При проведении секвенирования стоит учитывать патогенез инфекции, органы мишени, срок заболевания, выбор биообразцов, а также метод обогащения библиотеки для дальнейшего секвенирования. Несмотря на сложности, этот метод становится все более важным в эпоху глобализации, когда быстрое распространение новых вирусных штаммов представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Полученные данные о генетическом разнообразии вируса и поиск корреляционных связей с

клиническим течением инфекции имеет широкое применение в медицине, эпидемиологии, фундаментальной науке, а также разработке противовирусных препаратов. На примере цитомегаловируса (ЦМВ), авторами были проанализированы генотипы в различных биологических образцах от новорожденных детей с врожденной цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ).

Цель. На основании полученных генотипов вируса с удовлетворительным покрытием определить какой тип биоматериала детей с врожденной ЦМВИ эффективнее для секвенирования ЦМВ.

Материалы и методы. Были просеквенированы образцы крови, слюны, мочи у 46 новорожденных с врожденной ЦМВИ. Из биоматериалов выделялась тотальная ДНК; качественная детекция ДНК ЦМВ проводилась в режиме real-time PCR, подготовка библиотек и обогащение библиотек осуществлялось за счет гибридизации с мечеными олигонуклеотидами, таргетной NGS панелью зондов, включающих необходимые регионы вируса, секвенирование осуществлялось путем парно-концевых чтений (2x100bp) согласно инструкции производителя, с последующей биоинформатической обработкой полученных данных секвенирования.

Результаты. При секвенировании выделенной ДНК из 85 образцов от 46 младенцев, удовлетворительное покрытие было получено в регионе UL55 в 28 образцах; в регионе UL73 в 27 образцах; в регионе UL75 в 19 образцах. Все 3 региона с удовлетворительным покрытием было в 29 образцах. Минимально требуемое покрытие (выше 20x) при секвенировании регионов UL55 (gB), UL73 (gN), UL75 (gH) генома ЦМВ имелось чаще в образцах слюны (58,6%) и мочи (66,7%) по сравнению с кровью.

Выводы. Таким образом, авторами показано, что наиболее достоверным материалом для тестирования на генотип ЦМВ методом NGS является слюна – 58,6%; моча – 66,7% пациентов по сравнению с цельной кровью, что решает вопрос о неинвазивности, безопасности и удобстве сбора образцов для дальнейшей пробоподготовки и секвенирования.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА

Кацал К.С., Екимов А.А., Савина Н.Н., Анисенкова О.А., Зайцева Е.С.

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов», г. Санкт-Петербург, Россия

Основным антигеном для выработки специфического иммунитета при проведении вакцинации против гриппозной инфекции является гемагглютинин вируса гриппа, содержание которого определяется с помощью иммунохимического метода – одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД). Для проведения данного испытания необходимы специфические реагенты (стандартные антигены и моносpezifические сыворотки), поставляемые центрами системы Всемирной организации здравоохранения по мониторингу и противодействию гриппу.

Получение моноспецифических сывороток накладывает ряд сложностей для разработки данных реагентов, так как требует высокой степени очистки гемагглютинаина вируса гриппа от других белков вируса гриппа, в частности нейраминидазы, и разработки оптимальной схемы иммунизации биологических моделей для быстрого получения моноспецифических сывороток пригодных к использованию в ОРИД.

Среди подходов выделения гемагглютинаина можно отметить как расщепление при помощи детергентов и последующее хроматографическое разделение, так и использование ферментов для отщепления поверхностных белков от вирусной частицы с последующей очисткой продуктов реакции. Обработка вируса гриппа 1 % раствором саркозината натрия с последующим разделением при помощи колонки ХК 16/20, заполненной CaptoTM DEAE, (объем сорбента 10 мл; буфер нанесения - 0,02 М Трис 0,05 %, Саркозил pH 8,0; буфер элюирования - 0,02 М Трис 0,05 % Саркозил 1,5 М NaCl pH 8,0 при скорости потока 5 мл/мин и градиентном режиме элюирования 0-100 % в течение 40 CV), не принесла должных результатов по чистоте получаемых фракций. Другим способом являлась солюбилизация гемагглютинаина из вирусных частиц при помощи бромелаина. Ферментализ при подобранном соотношении белок : фермент проводили в буферном растворе состава 100 мМ Трис + 1 мМ ЭДТА + 2 мМ ДТТ pH 7.5 при температуре 37 °С в течение 16 часов. Очистку реакционной массы от кор-структур и нерасщепленного вируса проводили при помощи центрифугирования при 121000 g в течение 1 часа и охлаждении до температуры 4 °С. Полученный супернатант концентрировали не менее чем в 10 раз при использовании ультрафильтрационных модулей с пределом отсека 10 КДа Vivaflow 200 (Sartorius, Германия). Концентрированный супернатант подвергали хроматографической очистке при помощи эксклюзионной хроматографии на сорбенте Sephacryl S-300. Разделение осуществляли в колонке объемом 60 мл, подвижная фаза - ФБР pH 7,2, скорость потока – 2 мл/мин. Определение чистоты методом SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях подтверждают работоспособность метода и достижения получения гемагглютинаина вируса гриппа высокой чистоты (рисунок 1). Так же фракции четырех последовательных серий были оценены на содержание нейраминидазы определением наличия нейраминидазной активности по реакции с фетуином. Значение оптической плотности при длине волны 525 нм при разведении 1:4 для полученных образцов ($A=0,046-0,050$) не отличалось от контрольного буфера ($A=0,046$), что свидетельствует об отсутствии нейраминидазы в исследованных образцах.

Далее полученный гемагглютинин вируса гриппа в комбинации с адьювантом Фрейнда использовали для неоднократной иммунизации овец или кроликов (от трех до пяти раз с интервалом между введением антигена в 7 дней). Отбор крови осуществляли не ранее чем на 28 день после первой иммунизации, в случае кроликов, и не ранее, чем на 35 день после первой иммунизации в случае овец. Полученную сыворотку консервировали 1 % раствором азида или лиофилизировали. Качество полученных гипериммунных сывороток, моноспецифичных к гемагглютинуину вируса гриппа, оценивали в реакции двойной радиальной иммунодиффузии.

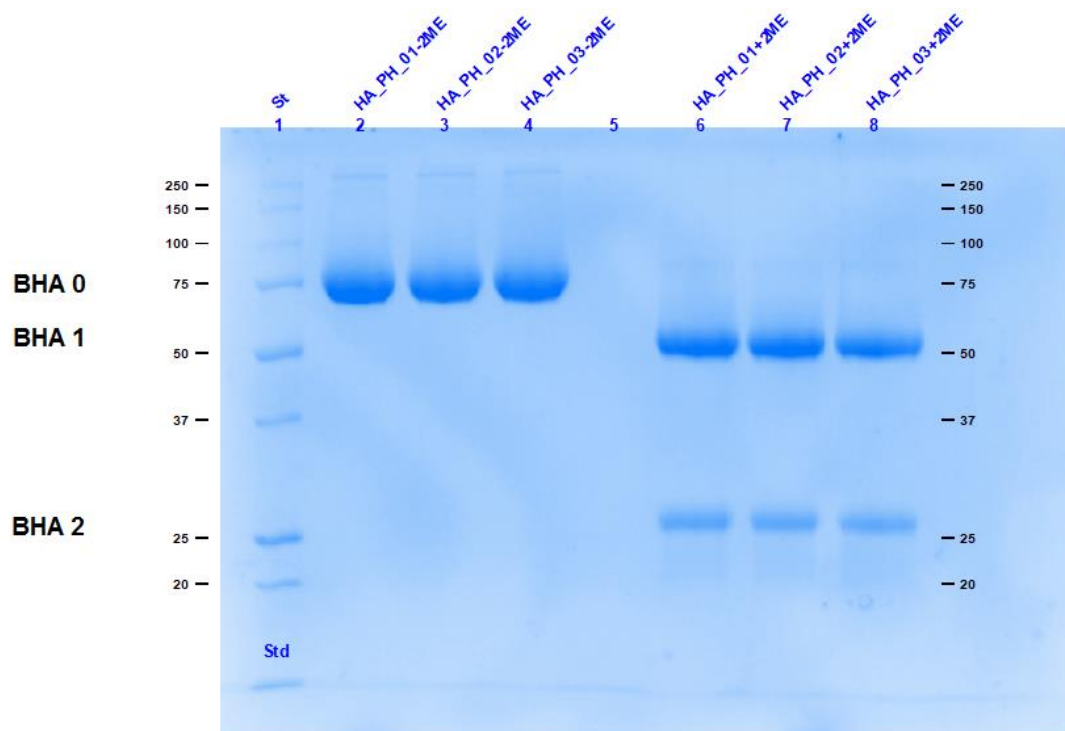


Рисунок 1 – Оценка чистоты фракций гемагглютинина для четырех последовательных серий гемагглютинина вируса гриппа подобного B/Phuket/3073/2013

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНИТЕТА У СОБАК ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИНЫ «КАРНИКАН-5R» ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ, ПАРВОВИРУСНОГО И КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТОВ, АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И БЕШЕНСТВА СОБАК

Климова А.А., Комарова А.А., Галкина Т.С.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Введение. Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции и бешенства собак (торговое название – Карникан-5R) разработана в ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир. Препарат прошёл контроль в ФГБУ «ВГНКИ» и зарегистрирован на территории Российской Федерации. В рамках клинических испытаний оценивались формирование и продолжительность гуморального иммунитета у целевых животных – собак.

Материалы и методы. Вакцина является двухкомпонентной: лиофилизированный компонент представлен аттенуированным вирусом чумы плотоядных (CDV) и стабилизатором. Жидкий компонент включает в состав вирусы парвовирусного энтерита собак (CPV-2), коронавирусного энтерита собак (CCoV), аденовирусной инфекции собак 2 серотипа (CAV-2), вируса бешенства (RabV), инактивированные аминоэтилэтиленимином, с добавлением адъюванта – гидроокиси алюминия. Клинические исследования проводились с

использованием собак в возрасте 10-12-недель и 2-5 лет, в каждой группе по 35 голов. Вакцину вводили подкожно с интервалом 21 сутки в объёме 1 дозы. Пробы крови у собак отбирали до вакцинации, через 35 суток и далее каждые 30 суток после введения препарата. Период наблюдения составил 12 месяцев с момента бустерной иммунизации. На заданных интервалах времени после вакцинации определяли титр вируснейтрализующих антител (ВНА) в реакции нейтрализации (CDV, CCoV и CAV-2), РТГА (CPV-2), реакции нейтрализации методом FAVN (RabV). Титр ВНА рассчитывали по формуле Кербера. Все эксперименты проводились согласно требованиям стандартов организации и одобрены комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Результаты. Были определены среднегрупповые значения титров ВНА и стандартное отклонение для каждого временного интервала. Уровень ВНА до иммунизации у щенков составил в отношении CDV, CCoV, CAV-2, RabV $<1,0 \log_2$, CPV-2 $3-6 \log_2$. У взрослых собак уровень ВНА составил в отношении CDV, CCoV, RabV $<1,0 \log_2$, CAV-2 $<2,0 \log_2$, CPV-2 $3-6 \log_2$. После введения вакцины на антигены, входящие в состав препарата, наблюдали активную реакцию иммунитета. Прирост ВНА после бустерной иммунизации к CDV составил у щенков $5,96 \log_2$, у взрослых собак $4,78 \log_2$, к CPV-2 у щенков $3,5 \log_2$, у взрослых собак $4,0 \log_2$, к CCoV у щенков $2,99 \log_2$, у взрослых собак $2,47 \log_2$, к CAV-2 у щенков $2,7 \log_2$, у взрослых собак $3,9 \log_2$, к RabV у щенков $2,16 \text{ ME}/\text{cm}^3$, у взрослых собак $2,08 \text{ ME}/\text{cm}^3$. Было установлено, что вакцина вызывает формирование иммунного ответа у собак к указанным вирусам после двукратной иммунизации. В течение периода наблюдения регистрировали постепенный прирост ВНА к CDV до 5 мес., к CPV-2 до 7 мес., к CCoV до 6 мес., к CAV-2 до 6 мес., к RabV до 4 мес. К окончанию периода наблюдения (13 мес. с момента первого введения вакцины) уровень ВНА незначительно снижался, в отношении пиковых показателей в среднем на $1,35$ и $1,04 \log_2$ к CDV (для щенков и взрослых собак соответственно), на $1,20$ и $1,00 \log_2$ к CPV-2, на $0,95$ и $1,01 \log_2$ к CCoV, на $0,30$ и $0,12 \log_2$ в отношении CAV-2, на $1,09$ и $0,87 \log_2$ в отношении RabV.

Заключение. Вакцина «Карникан-5R» индуцирует формирование гуморального иммунитета у целевых животных через 35 суток после первого введения. При двукратном введении продолжительность иммунитета составляет не менее 12 мес. независимо от возраста собак и может быть рекомендована для специфической профилактики указанных вирусных инфекций.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Карташов М.Ю.

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

Введение. Желтая лихорадка (ЖЛ) остается одной из самых распространенных природно-очаговых инфекционных болезней в мире. Поэтому в связи с ростом объема миграционных процессов, международного туризма и участвующими посещениями гражданами России стран, расположенных в тропических и субтропических поясах земного

шара и обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, встает вопрос о разработке быстрых и эффективных тестов для подтверждения завозных случаев и изучения возможного распространения данных вирусов комарами-переносчиками на территории РФ.

Цель работы состояла в разработке и оценке диагностических характеристик экспериментального набора реагентов для выявления РНК вируса желтой лихорадки методом изотермической амплификации с колориметрической детекцией.

Материалы и методы. Дизайн праймеров осуществляли при помощи программы Primer Explorer V5. Для получения положительного контрольного образца использовали методы ПЦР для наработки ампликона, клонирования в плазмиду pCR2.1-TOPO («Thermo Fisher Scientific», США), трансформацию клеток *E. coli* штамма TOP10 («Thermo Fisher Scientific», США), очистку рекомбинантной ДНК набором diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий («ДИАЭМ», Россия). Постановку изотермической амплификации осуществляли при помощи выбранного комплекта олигонуклеотидных праймеров (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), набора БиоМастер LAMP-Color (2×), ревертазы RNAscribe RT (Биолабмикс, Россия).

Результаты. На основе последовательностей гена белка NS1 вируса желтой лихорадки (ВЖЛ), взятых из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), выбран наиболее консервативный регион и с помощью программного обеспечения были подобраны 6 олигонуклеотидных праймеров, соответствующих 8 последовательностям гена белка NS1 ВЖЛ: внешние – F3 и B3, внутренние FIP (состоящий из участков F1c и F2) и BIP (B1c и B2), петлевые праймеры – LF и LB. С использованием праймеров F3 и B3 был получен ампликон, который был клонирован в плазмидную ДНК (pCR 2.1), которой трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Таким образом была получена рекомбинантная плазида pCR 2.1-YFV (длиной 4,166 т.п.н.), несущая вирусоспецифическую ставку. Оценка аналитической чувствительности экспериментального набора реагентов осуществляли с использованием последовательных разведений рекомбинантной плазмиды pCR 2.1-YFV с шагом 10 от 10^9 копий/мл до 10 копий/мл. Аналитическая чувствительность набора реагентов составила 10^4 копий/мл (рис. 1). Оценка повторяемости и воспроизводимости набора реагентов осуществлялась с использованием 10 повторов рекомбинантной плазмиды pCR 2.1-YFV в концентрации 10^7 копий/мл. Коэффициенты вариации для повторяемости и воспроизводимости составили 2,44% и 2,23%, соответственно. Контроль отсутствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов проводили с использованием в качестве исследуемых образцов pCR 2.1-YFV, ДНК человека, вода очищенная. В пробах с отрицательными контрольными образцами (вода очищенная, ДНК человека) показано отсутствие положительного сигнала, а в пробах с положительными контрольными образцами показано наличие положительного сигнала.

Таким образом, в данной работе получен экспериментальный набор реагентов для выявления РНК ВЖЛ методом изотермической амплификации, позволяющий выявлять РНК вируса менее, чем за 40 минут с колориметрической детекцией результатов в режиме. Данный набор реагентов, после прохождения государственной регистрации, может быть полезен при лабораторной верификации диагноза, также технология будет полезна для выявления ВЖЛ у комаров-переносчиков при изучении возможного распространения возбудителя как в эндемичных, так и в неэндемичных районах.

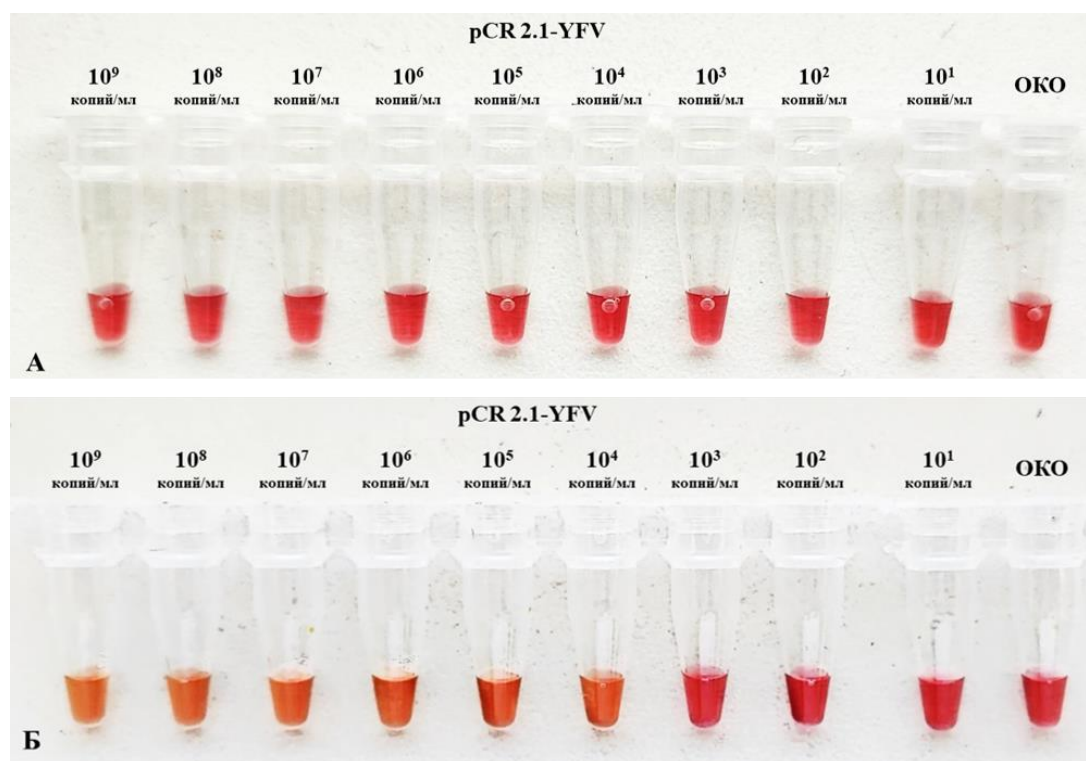


Рисунок 1 – Результаты определения диагностической чувствительности экспериментального набора реагентов. А – пробирки до реакции; Б – пробирки после реакции

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПАТОГЕННЫХ ХАБАРОВСК-ПОДОБНЫХ ХАНТАВИРУСОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

Крупская М.Н., Дзагурова Т.К.

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва, Россия

Ортохантавирусы — род РНК-вирусов, обладающих широким спектром хозяев. Такие хантавирусы, как Хантаан, Сеул, Амур, Пуумала и Добrava/Белград, вызывают у людей заболевания, объединенные названием геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС).

ГЛПС распространяется грызунами и является самым часто встречающимся природно-очаговым заболеванием на территории Российской Федерации. Хантавирусные заболевания характеризуются тяжёлым течением болезни, длительным периодом восстановления, летальность от 1 до 14% в зависимости от возбудителя. Многообразие клинических проявлений вызывает значительные трудности в диагностике ГЛПС. Кроме того, на сегодняшний день не существует эффективных способов лечения ГЛПС, а профилактические меры направлены на предотвращение контакта человека с грызунами (дератизацию), что не обеспечивает достаточный уровень безопасности. Из-за этого на сегодняшний день важно активное изучение хантавирусов и вызываемых ими инфекций.

Использование патогенных хантавирусов в производстве диагностических препаратов сильно усложняет процесс, так как они относятся ко 2-й группе патогенности и для работы с ними необходимы специальные условия. Некоторые непатогенные хантавирусы, в частности, вирус Хабаровск (*Orthohantavirus khabarovskense*), обладают сходными биологическими и иммунологическими характеристиками с патогенными хантавирусами, вызывающими ГЛПС, и могут быть использованы в качестве модели для различных исследований, включая разработку диагностических препаратов и лекарственных средств.

В нашем исследовании мы использовали непатогенные Хабаровск-подобные хантавирусы, для которых описано их дифференцирование при помощи полимеразной цепной реакции и секвенирования. Эти вирусы были ранее изолированы в культуре клеток Vero E6 от различных грызунов, отловленных в Хабаровском крае. Данные вирусы были восстановлены нами из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Контроль наличия вируса проводился путем оценки количества антигена вируса методом флуоресцирующих антител (МФА). Статус восстановленного штамма вирус получал при обнаружении антигена в МФА-тесте.

В ходе исследования зараженные культуры клеток снимали с флаконов трипсин-версеновой смесью на 10-14-й день после заражения и несколько раз осаждали на центрифуге с последующим ресуспендированием в физиологическом растворе. Полученную суспензию наносили на предметное стекло и фиксировали ацетоном. Для визуализации наличия антигена брали перекрестные сыворотки, содержащие антитела к вирусам Хантаан и Пуумала. После чего на препарат наносили кроличьи антитела против IgG и IgM человека, конъюгированные с флуоресцеином изотиоцианатом. Готовый препарат исследовали с водной иммерсией при помощи флуоресцентного микроскопа.

Нами было показано, что при определении антител в перекрестных реакциях непатогенные хантавирусы не отличаются от патогенных. Антитела к вирусу Пуумала имеют полный перекрест в реакции иммунофлуоресценции с антигенами непатогенных Пуумала-подобных хантавирусов.

В дальнейшем предполагается дифференциация данных штаммов методом нейтрализации после предварительного определения количественного содержания вируса в образцах методом титрования вирусов с использованием феномена фокусобразующих единиц вируса и при помощи секвенирования по Сэнгеру с последующим филогенетическим анализом. Полученные результаты позволят полностью охарактеризовать непатогенные Пуумала-подобные хантавирусы, что может быть использовано в дальнейшем при разработке диагностических препаратов.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННО АКТУАЛЬНОГО КАНДИДАТНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А (H5N1)

Кудря К.С.¹, Сергеева М.В.¹, Шамакова Д.А.¹, Красков Д.А.², Тарлавин Н.В.²

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО СПбГУВМ, г. Санкт-Петербург, Россия

Вирусы гриппа птиц представляют серьезную опасность и требуют постоянного наблюдения со стороны мирового общественного здравоохранения. Высокопатогенный вирус гриппа птиц типа А подтипа H5N1 является причиной массовой гибели домашней птицы, что приводит к огромным экономическим потерям в промышленном птицеводстве. Основными способами борьбы против гриппа птиц и вызываемых им панзоотий являются уничтожение поголовья птиц и вакцинация. В 2020-2021 году произошло существенное изменение антигенных свойств циркулирующих вирусов подтипа H5N1, обуславливающее необходимость обновления вакцины. В связи с этим нами был сконструирован рекомбинантный вирус гриппа A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) с модифицированным гемагглютинином и нейраминидазой от эпидемически актуального вируса гриппа А/черноголовая чайка/Сыктывкар/19987/2023 (H5N1, клайд 2.3.4.4b). В данной работе была проведена оценка безопасности и иммуногенности полученного штамма.

Гемагглютинин штамма A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) содержал трипсино-зависимый сайт расщепления. В клеточной культуре MDCK данный вирус не репродуцировался в отсутствие ТРСК-трипсина, что свидетельствует о низкопатогенном фенотипе. Стабильность ростовых свойств вируса в куриных эмбрионах оценивали на протяжении пяти пассажей. Инфекционная активность штамма составляла 8-9 lgЭИД₅₀/мл, гемагглютинирующая активность - от 2⁷ до 2⁹ ГАЕ. Максимальный титр вируса наблюдали через 36 - 48 ч после заражения. При этом у инфицированных эмбрионов не наблюдали геморрагий и повреждений, что свидетельствует о безопасности вируса A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) для куриных эмбрионов.

Также оценивали безвредность штамма при внутрибрюшинном введении мышам в объеме 0.5 мл в дозе 9 lgЭИД₅₀/животное. Мы не наблюдали ухудшения состояния или потери массы тела животных. При этом у животных наблюдали формирование вирус-специфических антител. Исследование различных способов инактивации штамма показало преимущество применения формалина или бетапропиолактона по сравнению с теотропином/мертиолятом для получения инаktivированного иммуногенно-активного материала.

Иммуногенность штамма в составе формалин-инаktivированного препарата с гидроокисью алюминия оценивали на суточных цыплятах. После иммунизации суточных цыплят в дозе 8,0 lgЭИД₅₀/животное у всех цыплят наблюдали формирование вирус-специфических антител в защитном титре (≥ 32) на 21 день после иммунизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2023 Г.

***Кулагина М.А., Волкова М.А., Чвала Ир.А., Осипова О.С., Ярославцева П.С.,
Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.***

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Грипп птиц – инфекционная вирусная болезнь птиц, наносящая серьезный экономический ущерб птицеводству. Эпизоотия гриппа как правило связана с сезонной миграцией диких водоплавающих птиц, что приводит к распространению вируса среди домашних птиц в хозяйствах различных форм собственности. На территории Российской Федерации в 2023 году было зарегистрировано 75 вспышек, вызванных вирусом высокопатогенного гриппа H5N1 среди домашних, диких и декоративных птиц.

Проведение серологических мониторинговых исследований необходимо для контроля эпизоотической ситуации по гриппу в птицеводческих хозяйствах и в дикой фауне, а также для контроля напряженности иммунитета и оценки эффективности вакцинации.

В данной работе представлены результаты серологических мониторинговых исследований за 2023 г. в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора.

В работе использовали сыворотки крови птиц, предоставленные Территориальными управлениями Россельхознадзора.

Для проведения исследований использовали наборы для выявления антител к вирусу гриппа птиц (ГП) иммуноферментным методом и наборы для выявления антител к вирусу ГП в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»; референтные антигены вируса ГП подтипов H5, H7 и H9 и соответствующие положительные сыворотки производства IZSve (Италия) и GD (Нидерланды). Для удаления термолабильных ингибиторов пробы инактивировали прогреванием при 56°C 30 минут.

В рамках эпизоотологического мониторинга в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в 2023 г. было исследовано 34900 проб сыворотки крови птиц из 69 регионов Российской Федерации.

Методом ИФА на наличие антител к вирусу ГП было исследовано 31400 проб от кур и индеек: 25610 проб из 217 птицеводческих хозяйств промышленного типа и 5790 проб из личных подсобных (ЛПХ) и коллективных фермерских хозяйств (КФХ). Положительные результаты от не вакцинированных птиц были получены из трёх хозяйств Нижегородской области и одного из Ростовской области. При исследовании положительных проб в РТГА была установлена принадлежность антител по гемагглютиниру к подтипу H9.

Антитела к вирусу ГП подтипа H9 были выявлены в пробах от вакцинированных кур и индеек в 21 промышленном хозяйстве (от 30% до 100% положительных проб от вакцинированного поголовья). В ЛПХ граждан, где проводилась плановая вакцинопрофилактика против вируса ГП подтипа H5, выявили от 41% до 100% положительных проб.

При исследовании в РТГА 3271 пробы от домашних птиц (куры, перепела, цесарки, индейки, индоутки, утки, гуси) постинфекционные антитела к вирусу ГП подтипа H5 были обнаружены в 85 пробах от кур из птицефабрики Республики Коми.

При исследовании 229 проб от диких, синантропных и зоопарковых птиц постинфекционные антитела к вирусу ГП подтипа H5 были выявлены в 5 пробах от диких гусей и уток в Вологодской области.

Таким образом, были обнаружены антитела к вирусу гриппа птиц подтипов H9 и H5 у домашних птиц не вакцинированных против ГП, и так же антитела к вирусу ГП подтипа H5 у диких птиц.

Закключение. Выявленные антитела к вирусу ГП подтипов H5 и H9 у не вакцинированных птиц свидетельствовали о циркуляции данных патогенов среди домашних и диких птиц на территории Российской Федерации. Недостаточный уровень поствакцинальных антител в популяции домашних птиц может стать причиной возникновения эпизоотии в промышленных птицеводческих предприятиях и личных подсобных хозяйствах и требует проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

ГУМОРАЛЬНЫЙ, Т- И В-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ ПРИ МНОГОКРАТНЫХ ИММУНИЗАЦИЯХ ИНАКТИВИРОВАННОЙ И ЖИВОЙ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ У МЫШЕЙ

*Ладыгина М.Д., Шуклина М.А., Шурыгина А.-П.С., Романовская-Романько Е.А.,
Ожерельева О.О., Варюшина Е.А.*

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

Ежегодная вакцинация против гриппа – эффективное решение для снижения уровня заболеваемости гриппом, включена в Национальный календарь профилактических прививок. Вакцинация инаktivированными гриппозными вакцинами (ИГВ) в течение нескольких сезонов может приводить к снижению эффективности последующих вакцинаций. Одним из решений данной проблемы является оптимизация тактики ежегодной вакцинации против гриппа и получение экспериментальных данных о влиянии чередования использования вакцин различных типов с разными способами введения (инаktivированные/живые; внутримышечно/интраназально) на формирование более широкого и стойкого поствакцинального иммунного ответа.

Целью работы являлось изучение антительного и клеточного иммунного ответа при повторной иммунизации прототипами ИГВ и живой вакцины на основе вируса гриппа с транкированным NS1 белком в различных комбинациях у мышей.

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (самки, 6-8 недель), 6 групп по 5 мышей в каждой группе. Для иммунизации использовали аттенуированный штамм вируса гриппа A/H1N1/Guandong-Maonan_NS124 (ЖГВ-Flu/NS124) или его очищенный инаktivированный аналог (ИГВ-H1N1). ИГВ-H1N1 вводили внутримышечно в дозе 1,5 мкг/мышь, ЖГВ-Flu/NS124 вводили интраназально в дозе 5,0 IgЭИД₅₀/мышь. Группа 1 получала иммунизацию 3-х-кратно по схеме ИГВ→ИГВ→ИГВ, группа 2 - ИГВ→ЖГВ→ИГВ, группа 3 – ЖГВ→ИГВ→ИГВ на 0, 21 и 105 дни. Группа 4 получала иммунизацию 2-х-кратно

по схеме ЖГВ→ИГВ, группа 5 – ИГВ→ИГВ, на 84 и 105 дни. В качестве контрольной группы использовали невакцинированных мышей (группа 6).

Уровень антител в сыворотке крови оценивали каждые 3 недели в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Методом проточной цитометрии оценивали содержание цитокин-продуцирующих ($IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$) $CD4+/CD8$ Т-эффекторных лимфоцитов памяти (ТЕМ) в селезенках и Т-фолликулярных хелперов (Тfh) в глоточных лимфоузлах, а также количество В-фолликулярных лимфоцитов (B220+ $CD23+IgD+$ или $IgG+FOB$) в глоточных лимфоузлах и селезенках, В-лимфоцитов герминативных центров (GC) селезенки на 112-й день эксперимента (7-й день после последней иммунизации во всех экспериментальных группах).

Введение ЖГВ-Flu/NS124 или ИГВ-H1N1 вызывало индукцию вирус-специфических антител (рисунок 1а). Максимальный уровень СГТ антител был отмечен после второй вакцинации в группе 2, получившей прайм-буст ИГВ: 1/512 на 63 день эксперимента (42 день после бустирующей иммунизации). После Дня 63 было зафиксировано снижение уровня антител, которые к Дню 105 составили 1/8. После отложенной иммунизации на 105-й день максимальные СГТ антител были отмечены в группе 3, получившей праймирующую иммунизацию Flu/NS124: 1/645, что достоверно отличалось от группы 1, получившей трехкратную иммунизацию ИГВ. В остальных группах мышей, получивших отсроченную третью иммунизацию на 105-й день, наблюдали прирост антител до уровня 1/388. В группах 4 и 5 на 7-й день после бустирующей иммунизации уровень вирус-специфических антител составил 1/114 и 1/143, соответственно.

Содержание $TNF\alpha+$, IL-2+, $IFN\gamma+TNF\alpha+$ и $IFN\gamma+TNF\alpha+IL-2+$ $CD4+ТЕМ$, $IFN\gamma+TNF\alpha+$ и $IFN\gamma+TNF\alpha+IL-2+$ $CD8+ТЕМ$ в селезенках было достоверно выше в группе 3 (ЖГВ→ИГВ→ИГВ) по сравнению со всеми опытными группами и контролем. Количество $IFN\gamma+TNF\alpha+IL-2+$ Тfh было достоверно выше в группе 3 по сравнению с контролем (рисунок 1б).

Содержание GC В-лимфоцитов в селезенках достоверно увеличивалось в группе 3, иммунированной 3-кратно, по сравнению с группой 4, которую иммунизировали 2 кратно (рисунок 1в). Общее количество FOB в селезенках и лимфоузлах достоверно не отличалось между всеми группами, включая контрольную.

Таким образом, многократные иммунизации прототипами живой и инактивированной вакцин против гриппа вызывают сходные гуморальные реакции. При этом уровень прироста антител после отложенной вакцинации был самым высоким в группе трехкратной иммунизации с праймированием ЖГВ. Праймирование прототипом интраназальной живой гриппозной векторной вакцины приводит к увеличению полифункциональных цитокин-продуцирующих Тfh в лимфоузлах, полифункциональных $CD4+/CD8+$ ТЕМ в селезенках, субпопуляции GC В-клеток в селезенках при отложенной иммунизации по сравнению с остальными экспериментальными группами и контролем. Это экспериментально обосновывает целесообразность включения живых гриппозных вакцин в схему ежегодных вакцинаций против гриппа.

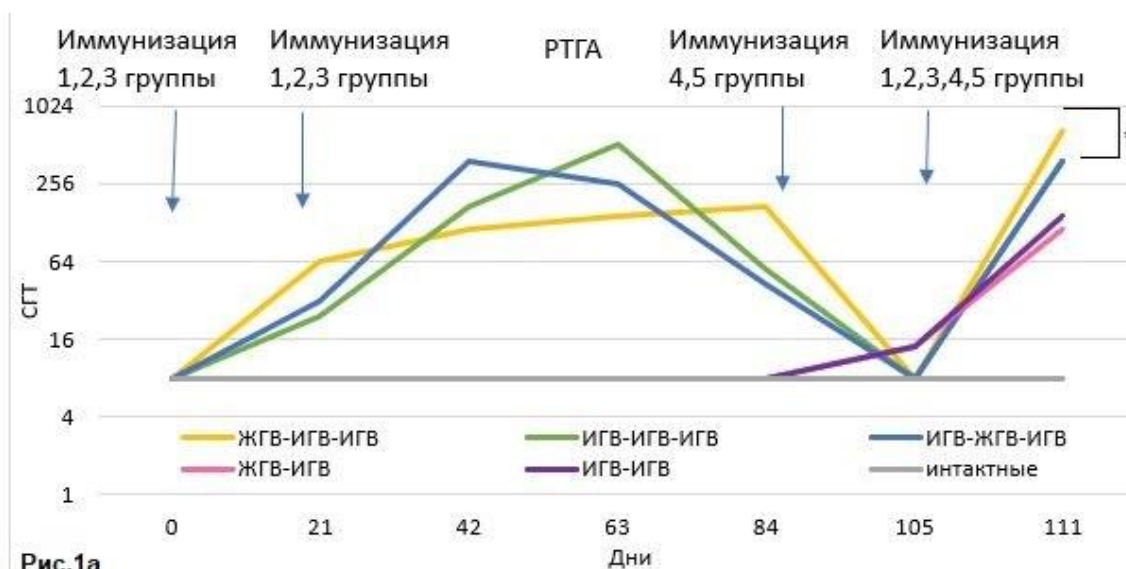


Рис.1а

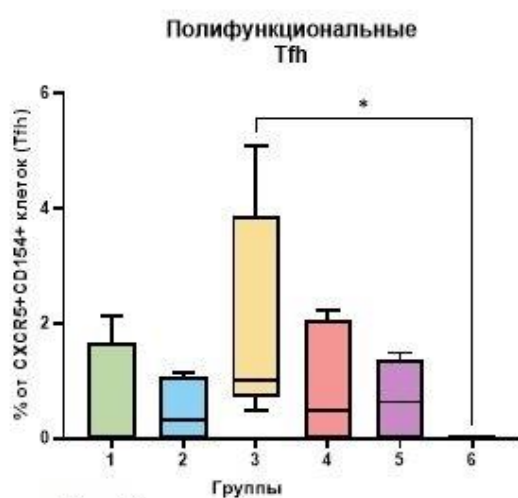


Рис.1б

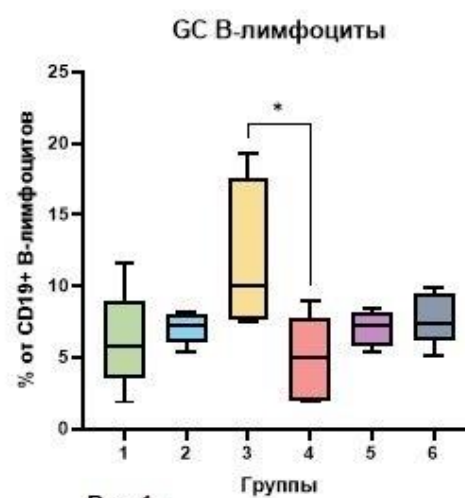


Рис.1в

Рисунок 1а – Динамика уровня антител на фоне иммунизаций H1N1-ИГВ и ЖГВ-Flu/NS124 (РТГА)

Рисунок 1б – CXCR5+CD154+ IFN γ +TNF α +IL-2+ Т-фолликулярные хелперы в подглоточных лимфатических узлах мышей на 7 день после отложенной/бустирующей иммунизации, стимуляция NP

Рисунок 1в – GC – В-лимфоциты герминативных центров селезенки мышей на 7 день после отложенной/бустирующей иммунизации. Группы: 1– ИГВ→ИГВ→ИГВ, 2 – ИГВ→ЖГВ→ИГВ, 3 – ЖГВ→ИГВ→ИГВ, 4 – ЖГВ→ИГВ, 5 – ИГВ→ИГВ, 6 – интактные.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДНК-ВАКЦИН, КОДИРУЮЩИХ ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ГРИППА ПОДТИПА А (H5Nx)

***Литвинова В.Р., Рудомётова Н.Б., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б.,
Старостина Е.В., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А.,
Карпенко Л.И., Ильичёв А.А., Рудомётов А.П.***

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

Вспышки гриппа птиц привели к массовому падежу животных, включая домашнюю и дикую птицу, и нанесли серьезный экономический ущерб сельскохозяйственным производителям. Совместная циркуляция различных подтипов вирусов гриппа А может приводить к появлению новых штаммов, патогенных для человека. Было обнаружено, что сегмент гемагглютинина А (H5), общий для высокопатогенных вирусов птичьего гриппа, легко рекомбинирует с другими вирусами гриппа. Таким образом, А (H5) является постоянным источником новых патогенных вариантов. В последние два десятилетия наблюдается рост числа случаев обнаружения вируса гриппа птиц А у млекопитающих, биологически более близких к человеку по сравнению с птицами, что вызывает опасения насчет возможной адаптации вируса и повышения его способности инфицировать людей. По состоянию на 5 января 2024 года вирусы гриппа А (H5) вызвали 969 случаев заражения людей, в том числе 495 смертей. В рамках программы готовности к пандемии гриппа Всемирная организация здравоохранения призывает активизировать работы по обеспечению готовности к чрезвычайной ситуации и разработке вакцин против гриппа птиц.

В настоящее время на рынок активно выходят новые типы вакцин, такие как ДНК- и мРНК-вакцины. Они становятся хорошей альтернативой производству вакцин против гриппа на основе яиц. Для них характерна быстрота разработки, дешевизна и безопасность производства, их легче хранить и транспортировать. Эти преимущества делают их перспективными для разработки вакцин против гриппа, в том числе высокопатогенного гриппа птиц с пандемическим потенциалом.

Гемагглютинин является преобладающим поверхностным белком вируса гриппа и выступает в качестве основного компонента современных противогриппозных вакцин. Однако было показано, что включение в состав вакцины нейраминидазы, которая также является поверхностным белком, снижает тяжесть заболевания и снижает титры вируса в легких у животных, поэтому разработка таких вакцин представляет интерес. В данной работе были разработаны экспериментальные ДНК-вакцины, кодирующие гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа подтипа А (H5Nx).

Цель работы состояла в разработке экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа подтипа А (H5Nx).

В ходе работы были разработаны и получены ДНК-конструкции под названием pVAX-H5 и pVAX-NA-N1. Конструкция pVAX-H5 кодирует белок гемагглютинина вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага T4; конструкция pVAX-NA-N1 кодирует белок нейраминидазы вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) с тетрамеризующим доменом тетрабрахиона *Staphylothermus marinus*. Была проведена двухкратная иммунизация мышей линии BALB/c полученными ДНК-конструкциями методом струйной инъекции (доза составляла 100 мкг).

Сыворотки крови иммунизированных животных были исследованы на наличие специфических антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Средний титр специфических антител в группе животных, иммунизированных pVAX-H5 и pVAX-NA-N1, составил $1:3 \times 10^4$.

Для оценки способности экспериментальных вакцин индуцировать специфический клеточный иммунитет через 14 дней после второй иммунизации у мышей извлекали селезёнки, которые были гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. Ответ оценивали по способности спленоцитов отвечать выделением IFN- γ на стимуляцию пептидами, входящими в состав вирусных белков. Методом ELISpot было показано, что в группе, иммунизированной экспериментальными ДНК-вакцинами pVAX-H5 и pVAX-NA-N1, активируется специфический клеточный иммунитет, выраженный в значительном повышении количества лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ .

Также сыворотки иммунизированных мышей исследовали в реакции вируснейтрализации на культуре клеток MDCK-SIAT1. В результате было установлено, что сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакцинами pVAX-H5 и pVAX-NA-N1, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), титр составил 1:4270.

Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГРИППОМ В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Магомедова М.Ш.¹, Бессонова Т.А.², Ларина Н.С.³, Ханугина Д.А.¹, Петраева И.П.⁴

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань, Россия

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области», г. Астрахань, Россия

³ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», г. Астрахань, Россия

⁴Астраханская клиническая больница ФГБУЗ ЮОМЦ ФМБА России, г. Астрахань, Россия

Введение. В последнее время во многих странах мира, в том числе и в России отмечается неуклонный рост различных инфекционных заболеваний. И несмотря на то, что медицинская наука сделала огромный шаг вперед в отношении диагностики и лечения различных инфекций, проблема острых респираторных вирусных инфекций остается весьма актуальной.

Так, среди огромного множества циркулирующих у человека инфекционных заболеваний, только ОРВИ и грипп способны вызывать вспышки заболеваний, затрагивающие сотни, а иногда даже и сотни тысяч человек. Именно такие инфекции практически ежегодно способны принимать и носить характер эпидемий. Статистика гриппа и ОРВИ указывает, что каждый год в мире только по официальным данным заболевают до 500 млн человек.

Цель работы. Изучить и проанализировать структуру заболеваемости гриппом в 2017 – 2024 гг. в Астраханской области.

Материалы и методы. При подготовке работы использовались карты эпидемиологического обследования лиц, заболевших гриппом, карты стационарных больных, а также данные собственных наблюдений.

Результаты исследования. Всего за период 2017 – 2024 гг. на территории Астраханской области зарегистрирован 4731 случай заражения человека гриппом, в том числе у детей грипп встречался в 67,1% (3173 человека). Возраст заболевших пациентов колебался от 7 месяцев до 89 лет. В половом соотношении, преобладали лица мужского пола – 62,2% (2945 человек).

Городская заболеваемость гриппом превышала таковую в районах Астраханской области в 16,7 раз, при этом в городской черте было зарегистрировано 94,3% (4461 случай), из которых дети – 67,6% (3016 человек).

Заболеваемость гриппом в сельских районах Астраханской области составила 5,7% (272 человек), из которых доля детей – 58,1% (157 человек).

Основными жалобами всех пациентов (взрослые и дети) были повышение температуры до 38 – 39°C (все пациенты), а также боль в горле 84,2% у взрослых и 94,2% - у детей. Насморк и заложенность носа отмечали 90,2% взрослых и 97,5% детей. В отличие от детей, большая часть взрослых пациентов – 99,9% в первые дни заболевания отмечали миалгию и/или артралгию, когда у детей подобный симптом отмечался в 87,7% случаев. Большая часть взрослых предъявляла жалобы на головную боль в лобной и височной областях – 99,6%, в то же самое время дети отмечали подобный симптом в 98,0%. Жалобы на быструю утомляемость и общую слабость предъявляли 33,4% и 32,4% взрослых, тогда как подобные жалобы у детей составляли 96,3% и 95,4%. Рвота и диарея отмечались в редких случаях как у взрослых, так и у детей и составили: 12,4% рвота у взрослых и 6,7% - у детей; диарея – 13,2% (взрослые) и 14,4% (дети).

Выводы. Заболеваемости гриппом подвержены пациенты всех возрастов, но в большей степени заболевание регистрировали у детей – 67,1%. Наибольшая заболеваемость гриппом была выявлена в городской черте – 94,3% заболевших. В 2021 году грипп в Астраханском регионе не регистрировали. Основными клиническими жалобами взрослых и детей являлись повышение температуры, насморк и заложенность носа, боль в горле, миалгии и/или артралгии, а также головная боль.

СТРУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ «ДЕТСКИМИ» ИНФЕКЦИЯМИ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ДО 1 ГОДА

Магомедова М.Ш.¹, Ларина Н.С.², Стрелкова Е.А.³, Шевцова Ю.П.³, Маркелова В.А.³

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань, Россия

²ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», г. Астрахань, Россия

³Астраханская клиническая больница ФГБУЗ ЮОМЦ ФМБА России, г. Астрахань, Россия

Введение. В последние годы отмечается увеличение числа случаев заражения человека инфекционными и паразитарными заболеваниями, особенно это касается детей. В числе многих заболеваний инфекционного генеза все чаще и чаще стали отмечаться случаи заражения так называемыми «детскими» инфекциями, которые регистрируются как среди детей, так и среди взрослых.

Детские инфекции – это обширная группа инфекционных заболеваний, которые отмечаются преимущественно в детском возрасте, и после выздоровления оставляют после себя стойкий иммунитет. К детским инфекциям относятся корь, краснуха, ветряная оспа, скарлатина, коклюш, эпидемический паротит. Детские инфекции занимали и продолжают занимать ведущее место в структуре детской заболеваемости, несмотря на развитие иммунизации.

Цель исследования. Изучить структуру заболеваемости детей в возрасте до 1 года «детскими» инфекциями на примере кори, краснухи, скарлатины и ветряной оспы в Астраханской области за 2022 – 2024 гг.

Материалы и методы. Обследовано 60827 детей в возрасте до 1 года, больных инфекционными и паразитарными заболеваниями, из которых, так называемые «детские» инфекции составили 1,01% (617 человек). Нозоареал проанализированных «детских» инфекций был изучен для четырех заболеваний: ветряная оспа, коклюш, скарлатина, и корь.

Результаты исследования. Случаи заражения детей в возрасте до 1 года ветряной оспой регистрировали, как в городской местности – 47,8% (221 случай), так и в районах Астраханской области – 52,2% (241 случай).

Второе место по числу случаев «детских» инфекций, занимал коклюш, на долю которого пришлось 14,4% (89 случаев). Случаи коклюша отмечались у детей, проживавших как в городской черте, так и в сельских районах Астраханской области, превалируя, в основном, у городских жителей – 56,2% (50 случаев).

Третье место в структуре заболеваемости «детскими» инфекциями среди детей в возрасте до 1 года, приходилось на корь – 10,4% (64 случая), случаи которой были зарегистрированы в городской черте.

Число случаев заражения детей скарлатиной составило 0,3% (2 человека). Данные случаи были зафиксированы у детей, проживавших в Володарском и Приволжском районах – по 1 человеку в 2022 и 2024 гг. соответственно.

В большинстве случаев у маленьких пациентов отмечались такие жалобы, как повышение температуры выше 38,0°C – 85,9% (530 человек), синдром экзантемы – 85,6% (528 человек). Кроме данных жалоб, отмечались такие, как катаральные проявления верхних

дыхательных путей – 13,4% (101 человек), поражение нижних дыхательных путей – 18,2% (112 человек), конъюнктивит – 9,7% (60 человек), рвота – 15,7% (97 человек) и региональная лимфаденопатия – 13,8% (85 человек). В редких случаях отмечалось поражение ЦНС в виде энцефалита – 0,5% (3 человека) и ангина – 0,3% (2 человека).

После установления окончательного диагноза, всем заболевшим детям назначалось медикаментозное лечение.

Выводы. Число случаев инфекционных заболеваний у детей Астраханской области в последние годы остается большим. В структуре заболеваемости детей первого года жизни основными, так называемыми «детскими» инфекциями, были ветряная оспа, коклюш и корь. Выявлена пораженность детского населения как в районах Астраханской области, так и непосредственно в городской черте. Основной жалобой всех заболевших детей являлось повышение температуры выше 38,0°C и экзантема.

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРИ У ДЕТЕЙ. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ

*Магомедова М.Ш.¹, Бессонова Т.А.², Ларина Н.С.³, Ханугина Д.А.¹, Алексашина Д.С.⁴,
Вакалова К.А.¹*

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань, Россия

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области», г. Астрахань, Россия

³ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», г. Астрахань, Россия

⁴Астраханская клиническая больница ФГБУЗ ЮОМЦ ФМБА России, г. Астрахань, Россия

Введение. В последние годы во многих субъектах Российской Федерации отмечается рост числа различных инфекционных и паразитарных заболеваний среди людей. Иногда они носят характер спорадических заболеваний, иногда - вспышек, а нередко могут протекать в виде эпидемий, затрагивая огромные группы людей, и охватывая целые регионы. Одним из таких заболеваний, способным в кратчайшие сроки вызвать эпидемию, является корь.

Цель исследования. Провести ретроспективный анализ структуры заболеваемости корью среди детей Астраханской области за 2018 – 2022 гг.

Материалы и методы. С 2018 по 2022 гг. на территории Астраханской области зарегистрировано 259 случаев кори, из которых 71,8% (186 человек) случаев было выявлено у детского населения. Случаи кори регистрировались у детей всех возрастов.

Клинический диагноз был выставлен на основании данных клинической картины заболевания, жалоб, эпидемиологического анамнеза и данных лабораторного исследования (обнаружение специфических антител класса IgM методом иммуноферментного анализа (ИФА)).

Результаты исследования. Все дети, у которых была выявлена корь, условно были разделены на три возрастные группы: первая возрастная группа (возраст детей составлял от 1

месяцев до 1 года), вторая возрастная группа (1 – 7 лет) и третья возрастная группа (7 – 17 лет).

Рассматривая наличие жалоб, согласно возрастным групп, можно отметить, что у детей первой возрастной группы отмечался ларингит – 72,6% (53 человека). Наличие фарингита отмечали 61,6% (45 человек). Также у детей данной группы отмечался насморк – 80,2% (59 человек), повышение температуры – 80,2% (59 человек), конъюнктивит – 67,1%, кандидоз – 93,2% (68 человек). В редких случаях у детей 1 группы выявлялся стоматит – 19,2% (14 человек).

У детей второй возрастной группы во всех случаях отмечались жалобы на лихорадку, ларингит и гиперемия зева. Фарингит отмечали 69,5% (66 человек), а наличие насморка и конъюнктивита – 77,9% (74 человека) и 74,7% (71 человек) соответственно. Реже у детей отмечались стоматит и кандидоз – 35,8% (34 человека) и 28,4% (27 человек), соответственно.

У детей третьей группы, также, как и в предыдущих группах, во всех случаях отмечались лихорадка и гиперемия зева. Но в отличие от детей первой и второй групп, частыми жалобами детей данной группы были конъюнктивит, насморк и ларингит – 83,3% (15 человек), 61,1% (11 человек) и 55,6% (10 человек), соответственно. В редких случаях у детей отмечались фарингит и стоматит – по 38,9% (по 7 человек) и кандидоз – 16,7% (3 человека).

После установления окончательного диагноза, всем пациентам проводилось медикаментозное лечение.

Выводы. В последние годы среди детей продолжают регистрировать случаи кори. Чаше корь выявляли у детей второй возрастной группы (1-7 лет) - 51,1% (95 человек) и первой возрастной группы (до 1 года) – 39,2% (73 человека). Наибольшее число случаев кори было зафиксировано у детей, проживавших в городском округе – 73,7% (137 человек). Основными жалобам пациентов при кори были наличие лихорадки, гиперемия зева, ларингит, конъюнктивит и кандидоз у детей до 1 года.

НА-СПЕЦИФИЧНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ СУЩЕСТВУЮЩИМИ Т-КЛЕТКАМИ ПАМЯТИ И НЕ ЗАВИСИТ ОТ СЕЗОННОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Малеева А.В., Шокина В.А., Найденышева З.К., Кудрявцев А.В.

*ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины»
Роспотребнадзора, г. Москва, Россия*

Основная задача вакцинации - формирование популяционного иммунитета против соответствующей инфекции. Используемые в настоящее время вакцинные платформы разнообразны, их эффективность варьирует. Значимой проблемой в разработке универсальной вакцины против гриппа является дрейф вирусных генов, поэтому необходимо создавать обновленные вакцинные препараты каждый год.

Для эффективной защиты от инфекции необходима своевременная активация и эффективное функционирование как В-клеточного звена и производимых ими антител, так и

Т-клеточного звена. В отличие от гуморального иммунитета для Т-клеток, специфичных к гриппу, показана кросс-реактивность на различные подтипы вируса и варианты дрейфа генов.

Сезонные вакцины против гриппа нацелены на формирование стойкого антительного ответа против гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы. В исследованиях было показано, что Т-клеточные эпитопы, происходящие из гемагглютинаина являются высоко консервативными и способны обеспечить защиту от тяжелой инфекции. Главной целью исследования было определение влияния сезонной вакцинации на НА-специфичный Т-клеточный ответ у здоровых доноров.

В исследовании приняли участие 47 здоровых взрослых донора без сезонной вакцинации против гриппа 2024 года или через 1-12 недель после вакцинации и вне зависимости от наличия перенесенных эпизодов гриппа и/или ОРВИ в анамнезе. Из венозной крови были выделены периферические мононуклеарные клетки (РВМС), которые инкубировали в течение суток с НА сезонных штаммов 2024 года. После этого методом ELISpot определяли наличие НА-специфичного Т-клеточного ответа путем подсчета IFN γ -продуцирующих клеток. Большинство доноров имеют выраженный НА-специфичный Т-клеточный ответ, однако встречаются те, у кого он полностью отсутствует. Статистически значимой разницы между НА-специфическим Т-клеточным ответом у вакцинированных и невакцинированных доноров не обнаружено. Кроме того, количество НА-специфических Т-клеток не изменяется через 10, 30 и 60 дней после вакцинации НА-содержащим препаратом.

Для оценки функциональной активности НА-специфичных Т-клеток памяти РВМС после инкубации с НА сезонных штаммов 2024 года анализировали с помощью проточной цитометрии на соотношение CD8/CD4 Т-клеток и Th1/Th2/Th17 Т-хелперов. Для вакцинированных доноров характерна преобладающая активация CD4⁺ Т-клеток по сравнению с CD8⁺ Т-клетками. Для невакцинированных доноров показана преимущественная активация CD8⁺ Т-клеток. Среди НА-специфичных CD4⁺ Т-клеток преобладают Th1 вне зависимости от сезонной вакцинации. Также в ответ на антигенную стимуляцию активируются Th17 отсутствуют Th2 Т-клетки вне зависимости от сезонной вакцинации. Значимых фенотипических изменений в НА-специфичных CD4⁺ Т-клетках не наблюдается на 10, 30 и 60 дни после вакцинации НА-содержащим препаратом

С помощью биоинформатического анализа были определено, что наиболее доминантные эпитопы НА представляются в редкие для популяции аллели HLA. Для частых аллелей HLA характерно большее эпитопное разнообразие с гораздо меньшей доминантностью. Большинство эпитопов происходит из консервативных участков последовательности НА, которые не подвергаются выраженному дрейфу генов.

Данные результаты говорят о том, что вакцинация сезонными моно компонентами (например, НА-содержащими препаратами) вируса могут сдвигать пул антиген-специфических Т-клеток в сторону формирования менее доминантных клонотипов в то время, как у невакцинированных доноров сохраняются и активируются в ответ на антиген преимущественно высоко доминантные кросс-реактивные клоны.

Несмотря на то, что гемагглютинин не является наиболее иммунодоминантным антигеном для Т-клеточного звена, уже существующие кросс-реактивные Т-клеточные клонотипы после предыдущих инфицирований или вакцинаций, способны обеспечить функционально активный иммунитет против гриппа.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122030900051-9.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ (H5) ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ «АВИФЛУВАК» НА ОСНОВЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАСЛЯНОГО АДЬЮВАНТА

Мороз Н.В., Фролов С.В., Долгов Д.Л., Кукленкова И.В.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Глобальные изменения в последние годы в логистических цепочках поставок сырья привели к его существенному удорожанию. Это коснулось также и отечественной индустрии ветеринарной биофармацевтики, в частности, масляных адъювантов для производства инактивированных вакцин, доля которых в составе этих препаратов достигает 70%. Такие неблагоприятные явления на рынке сырья побуждают отечественных производителей ветеринарных вакцин искать альтернативы применявшимся ранее адъювантам.

В статье представлены результаты исследований по определению иммунобиологических и физических свойств экспериментального образца вакцины против гриппа птиц (H5) инактивированной эмульсионной, изготовленного на основе экспериментального масляного адъюванта «Muctavac 70», аналога адъюванта «Montanide ISA 70VG», используемого для производства вакцины АвиФлуВак. Экспериментальный масляный адъювант, также как и «Montanide ISA 70VG», объединяли с антигеном вируса гриппа H5N1 в весовом соотношении 70:30 и эмульгировали при помощи лабораторного гомогенизатора таким образом, чтобы в прививном объёме обоих препаратов концентрация антигена составляла $9 \log_2$ ГАЕ.

Сравнивали иммунобиологические и физические свойства экспериментальной вакцины и коммерческой вакцины АвиФлуВак.

Изучение физических свойств показало, что стабильность и вязкость вакцинной эмульсии экспериментального и коммерческого препарата показали сходные характеристики: у обоих эмульсия после хранения в течение 14 суток при температуре 37°C не проявляла признаков разрушения (водная фаза на дне пробирок отсутствовала) и обладала низкой вязкостью – 34,4 мм²/с.

Для изучения иммунобиологических свойств было сформировано 3 группы цыплят 30-суточного возраста по 10 голов, 2 из которых прививали коммерческой и экспериментальной вакцинами в прививном объёме 0,5 см³, а 3 группа была непривитой в качестве отрицательного контроля. Через 28 суток после вакцинации изучали уровни антител к вирусу гриппа H5 во всех группах и проводили контрольное заражение цыплят полевым изолятом вируса гриппа H5.

Результаты серологических исследований показали, что в группе, привитой коммерческой вакциной, титры антител были высокими, достигая среднегруппового значения $8,8 \log_2$, тогда как экспериментальный препарат индуцировал титры на уровне $5,7 \log_2$, что в 8,5 раз ниже, чем коммерческая вакцина.

Анализ иммуногенной активности инактивированных масляных вакцин показал, что формирование защиты у иммунизированных цыплят от контрольного заражения вирулентным вирусом гриппа птиц H5 происходило только в группе, привитой коммерческим препаратом – все цыплята остались живы, клинических признаков болезни не отмечалось, таким образом защита составила 100%. В группе с испытуемым адъювантом

наблюдали болезнь и гибель цыплят, защита составила 50%. В непривитой контрольной группе вся птица заболела и погибла.

Клинические наблюдения, осмотр мест введения препаратов и посмертное изучение мышечной ткани у цыплят показали, что все образцы вакцин были безвредны и не вызывали каких-либо патологических изменений на месте введения препарата, и не оказывали какого-либо негативного влияния на общее состояние организма птицы.

Обобщив все данные лабораторных исследований, мы пришли к выводу, что по своим иммунологическим свойствам экспериментальная вакцина против гриппа птиц (H5) на основе адьюванта «Muctavac 70» уступала коммерческой вакцине АвиФлуВак.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВЕКТОРОВ *IN VITRO*

***Мустафаева А.С., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А.,
Шурыгина А.-П.С., Стукова М.А.***

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

Перспективным подходом к повышению эффективности терапии злокачественных новообразований является применение онколитических вирусов, которые комплексно воздействуют на опухоль путем онколизиса, инициации противоопухолевого иммунитета, ремоделирования микроокружения опухоли и разрушения сосудистой сети опухоли.

Вирус гриппа А обладает уникальными возможностями с точки зрения разработки на его основе гиператтенуированных векторов для целевой экспрессии трансгенов в зоне опухолевого роста, таких как цитокины и хемокины, действие которых направлено на усиление противоопухолевого иммунного ответа и привлечение иммунных клеток в опухоль. Сегментированный геном и разнообразие антигенных вариантов вируса гриппа А дает возможность сконструировать оптимальный онколитический вектор, обладающий высокой безопасностью и специфичностью к опухолевым клеткам и не инактивирующийся факторами специфического иммунитета при введении его пациентам.

Для оценки онколитического потенциала вируса гриппа изучена способность репортерных гриппозных векторов инфицировать опухолевые клеточные культуры и экспрессировать репортерный белок.

Материалы и методы. Рекомбинантные штаммы на основе вируса гриппа A/PR/8/1934 с модифицированным геномным сегментом NS получали методом обратной генетики с использованием плазмидного вектора pHW2006. Рекомбинантные гриппозные векторы были охарактеризованы по репродуктивным свойствам на культурах клеток Vero, MDCK, глиобластомы человека (A172, T98G, R1, T2), глиомы крысы C6, колоректальной аденокарциномы CaCo-2, меланомы B16F12, а также в системе развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). Люциферазную активность рекомбинантных штаммов определяли с использованием коммерческого набора Nano-Glo Luciferase Assay System. Количественный анализ инфицированных клеток проводили методом проточной цитометрии.

Результаты. Получены гриппозные штаммы на основе вируса A/PR8/NS124, содержащие модифицированный ген NS, кодирующий укороченный белок NS1 (NS1₁₂₄) и субъединицу нанолуциферазы nLuc. Генетический сегмент NS у штаммов T_NS124-Luc и E_NS124-Luc кодировал слитую белковую последовательность NS1₁₂₄ вируса гриппа и nLuc. В векторах T_NS124-2A-Luc и E_NS124-2A-Luc был использован сайт расщепления 2A, обеспечивающий котрансляционное разделение белковых последовательностей NS1₁₂₄ и nLuc. Для формирования эластазо-зависимого фенотипа в штаммах E_NS124-Luc и E_NS124-2A-Luc были введены точечные мутации в гене гемагглютинаина.

Методом ОТ-ПЦР была показана генетическая стабильность химерной вставки в гене NS при пассировании для всех полученных гриппозных векторов.

Оценка ростовых характеристик рекомбинантных вирусов в культурах клеток Vero, MDCK и системе РКЭ показала, что трипсин-зависимые штаммы T_NS124-Luc и T_NS124-2A-Luc демонстрируют высокую продуктивность в РКЭ, достигая титров свыше 8,5 lg ЭИД₅₀/мл, в то время как эластазо-зависимые штаммы E_NS124-Luc и E_NS124-2A-Luc эффективнее реплицируются в клетках MDCK с максимальными титрами до 7,5 lg ТИД₅₀/мл. Репликационная активность векторов коррелировала с уровнем люциферазной активности и зависела от наличия специфической протеазы в среде.

Для оценки онколитического потенциала была изучена способность вирусных векторов заражать опухолевые клеточные культуры и экспрессировать в них репортерный белок. Для всех штаммов наибольшая инфекционная активность наблюдалась в клетках CaCo-2 (88%) и в клетках глиомы крысы C6 (95%), тогда как инфицирование клеточных линий глиобластомы человека A172 и T98G не превышало 50%. При этом уровень люминесценции, наблюдаемый в клеточных лизатах, был на высоком уровне во всех клеточных линиях ($>10^4$ OE). При заражении первичных культур глиобластом R1 и T2, полученных из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «злокачественная глиома», доля инфицированных клеток по сравнению с опухолевыми клеточными культурами была ниже ($\leq 40\%$), однако интенсивность люминесцентного сигнала оставалась высокой ($>10^4$ OE), что свидетельствует об активной экспрессии трансгена. При этом на всех опухолевых культурах рекомбинантные штаммы, содержащие сайт 2A, демонстрировали статистически значимо более высокий уровень инфицирования и интенсивности люминесценции.

При использовании предварительно облученных опухолевых клеточных линий было показано, что опухолевые клетки, подвергшиеся действию радиации, демонстрируют более высокую восприимчивость к инфекции, а уровень репортерной активности остается стабильным на уровне $>10^4$ OE, что подтверждает перспективность данных векторов для дальнейших исследований в области онколитической виротерапии (рис. 1).

Таким образом, можно заключить, что сконструированные репортерные гриппозные векторы обладают высокой инфекционной активностью в отношении различных опухолевых клеточных линий, при этом наиболее выраженный эффект наблюдается у конструкций, содержащих сайт 2A.

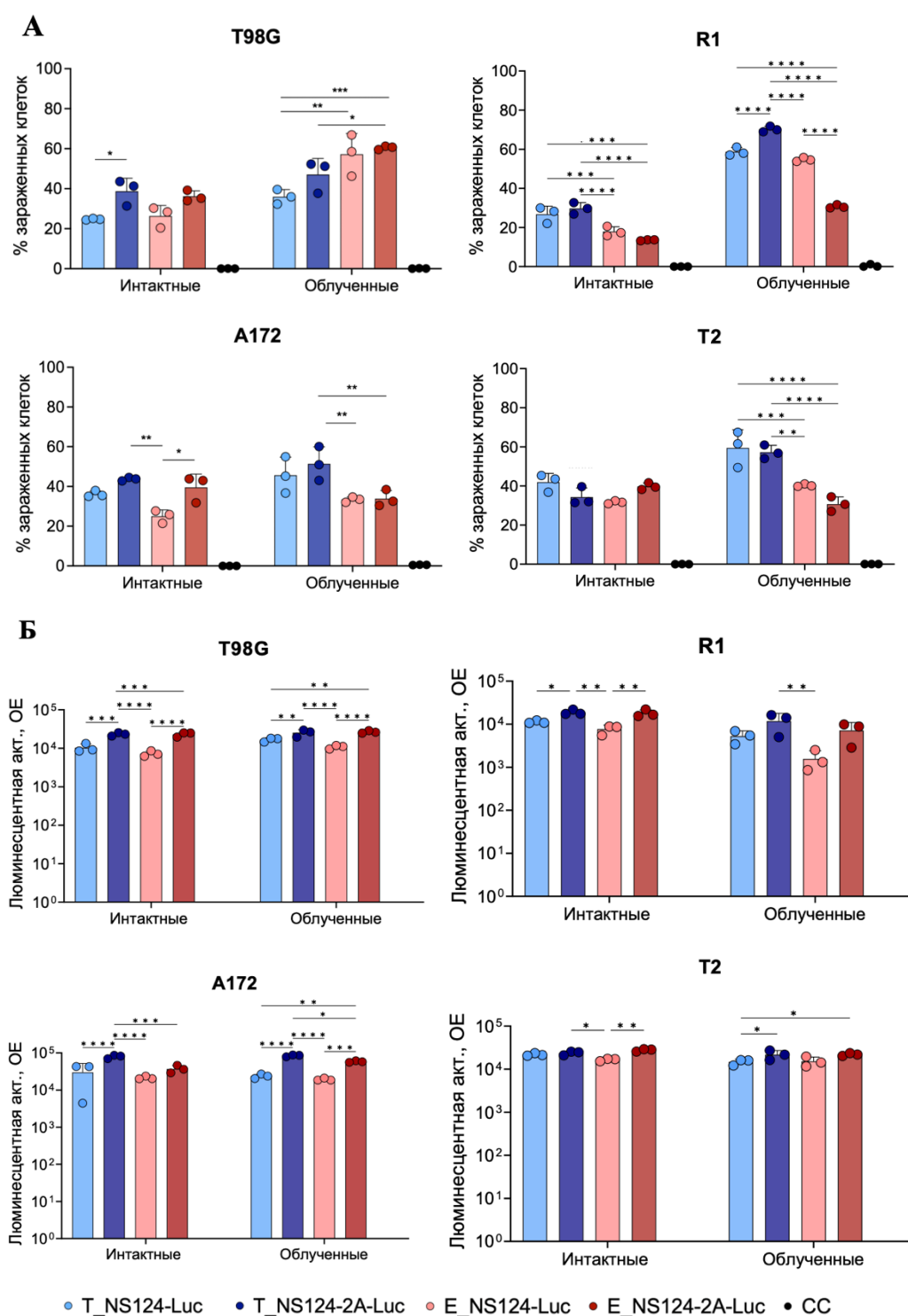


Рисунок 1 – Инфекционная (А) и люминесцентная (Б) активность репортерных векторов при заражении облученных и необлученных перевиваемых (Т98G, А172) и первичных (R1, Т2) клеточных линий глиобластомы человека

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ (PRRS) У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ МЫШЕЙ В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ ГРИППА А

Олейник В.А.^{1,2}, Плотникова М.А.¹, Романовская-Романько Е.А.¹

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), г. Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Врожденный иммунный ответ играет важнейшую роль в защите организма от вирусных патогенов, и важной его частью являются паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), в том числе толл-подобные рецепторы (TLRs) и RIG-I-подобные рецепторы (RLRs). Известно, что инвазия вирусов, в том числе вируса гриппа, приводит к активации внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме, эндосомах и лизосомах, а также MDA5 и RIG-I, которые являются цитозольными сенсорами вирусной РНК, не связанными с мембранами клетки.

Цель. Разработка количественной мультиплексной системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для оценки молекулярных механизмов регуляции паттерн-распознающих рецепторов TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5, RIG-I, а также исследование уровня экспрессии этих генов в легких и селезенках молодых и старых мышей при инфицировании двумя различными штаммами вируса гриппа.

Материалы и методы. В исследование были взяты две группы животных — молодые (2 мес.) и старые (8 мес.) мыши линии BALB/c. Забор органов животных производился спустя 24 часа после интраназального заражения вирусом гриппа А/PR8/34 (H1N1), и PR8/34 NS124 (H1N1), вакцинным штаммом, а также у контрольных (интактных) животных. Исследование РНК, выделенной из легких и селезенок мышей, проводилось методом ОТ-ПЦР с помощью разработанной ПЦР тест-системы с нормировкой по референс-генам Rplp0, Hprt1 и Ubc. Анализ уровней экспрессии производился с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода.

Результаты. В ходе научно-исследовательской работы была разработана тест-система на основе мультиплексной ПЦР для оценки экспрессии генов эндосомальных сенсоров TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, а также цитозольных сенсоров MDA5 и RIG-I, эффективность амплификации которых составила 99% и 106% для TLR3 и TLR7 соответственно и по 107% для остальных генов.

Согласно полученным нами результатам, инфицирование мышей ВГА индуцировало развитие врождённого иммунного ответа преимущественно локально (в лёгких), но не на системном (в селезенках) уровне.

Результаты, представленные на рис. 1, отображают экспрессию генов интереса в легочной ткани мышей обеих групп, происходит значительное увеличение экспрессии TLR7 и TLR8 у молодых мышей и снижение экспрессии генов TLR9 и MDA5 у обеих групп. Также интересно отметить, что статистически достоверно увеличивается экспрессия RIG-I в легких старых мышей при заражении А/PR8/34 NS124 и практически не изменяется при заражении А/PR8/34. Увеличение экспрессии генов TLR7 и TLR8 в легких молодых мышей было

ожидаемо, так как TLR7 и TLR8 являются рецепторами, лигандами которых является оцРНК, чем и представлен геном ВГА.

По результатам эксперимента уровни TLR9 и MDA5 значительно снижались в ответ на инфицирование мышей вирусом гриппа. Подавление иммунного ответа, индуцированного TLR9, который узнаёт вирусные и CpG-ДНК, является важной стратегией уклонения от врожденного иммунитета, используемой, например, вирусом Эпштейна-Барр. Однако маловероятно, что РНК-содержащий ВГА имеет какие-либо схожие механизмы супрессии TLR9. Подавление уровня MDA5, агонистом которого являются дцРНК, также требует дальнейшего исследования.

При изучении уровней экспрессии генов интереса в селезёнках мышей (данные не представлены) мы не выявили статистически достоверных изменений экспрессии каких-либо исследуемых нами генов. В нашей работе исследование экспрессии проводили через 24 часа после инфицирования, к этому времени происходит около 3–4 циклов репликации вируса и говорить о существенных проявлениях признаков заболевания преждевременно. Предположительно, на более поздних сроках инфицирования изменение экспрессии исследуемых генов PRRs в селезёнке были бы более существенными.

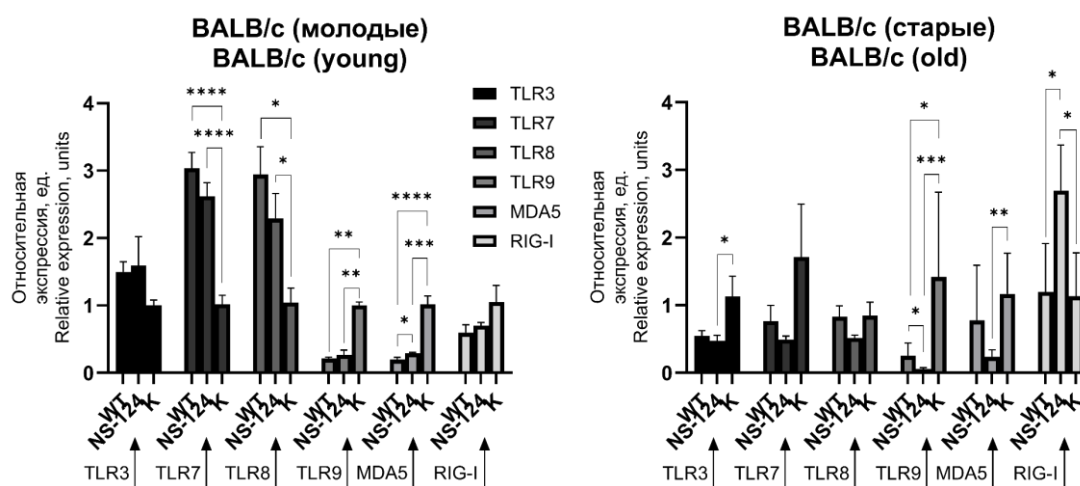


Рисунок 1 – Относительная экспрессия генов TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5 и RIG-I в легких молодых и старых мышей соответственно, зараженных вирусом гриппа A/PR8/34 (WT), A/PR8/34 NS124 (NS-124) и у контрольной группы (K). Достоверность различия экспрессии определяли с помощью однопараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Холма — Шидака для попарного сравнения групп образцов: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$

СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ НИЗКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H9N2 В 2024 Г.

*Осипова О.С., Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Грехнева А.Д.,
Зиняков Н.Г., Щербина А.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.*

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Вирус гриппа подтипа H9, относящийся к вирусам низкопатогенного гриппа птиц, обладает зоонозным потенциалом. Среди млекопитающих вирус выделяли от собак, свиней, лошадей, норок, хорьков, мышей и человека. Данный возбудитель широко распространен в Китае, странах Ближнего Востока и Северной Африки. Вирус H9 регистрировали на территории Российской Федерации с 2012 года в птицеводствах Дальнего Востока. Учитывая информацию о широком распространении вирусов гриппа во всем мире и вероятность появления новых реассортантов при межвидовой трансмиссии, является актуальным изучение свойств циркулирующих вирусов этого подтипа.

Целью исследования явилось изучение биологических свойств выявленного вируса гриппа птиц (ВГП) подтипа H9N2.

В качестве материала были использованы пробы внутренних органов от птиц, поступивших из разных регионов РФ в 2024 году. Выделение РНК осуществляли набором «РИБО-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Генетический материал ВГП выявляли в ОТ-ПЦР в режиме реального времени. 10% суспензию биоматериала на ФБР (рН 7,2-7,4) инокулировали 10-суточным развивающимся куриным эмбрионам (РКЭ) в объёме 0,2 см³. В случае реакции гемагглютинирующей активности (РГА) в титре не ниже 1:16, идентификацию проводили в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) с сыворотками против вирусов ГП подтипов H1-H16 (IZISVe, Италия) согласно рекомендациям ВОЗЖ.

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). В работе использовали нуклеотидные последовательности вирусов ГП подтипа H9, опубликованные в базе данных NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и платформу EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit.

В ходе исследований проб биологического материала в 2024 году в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») был зарегистрирован случай выявления вируса гриппа у кур в Волгоградской области. В ОТ-ПЦР-РВ был выявлен генетический материал вируса гриппа типа А и идентифицирован подтип H9N2.

Накопленный в РКЭ вирус обладал высокой гемагглютинирующей (титр в РГА составил 1:512 с 1% взвесью куриных эритроцитов) и инфекционной активностью (реплицировался в РКЭ до титра 9,2 lgЭИД₅₀/мл). Идентификация в РТГА со специфическими сыворотками H1-H16 показала принадлежность выделенного патогена к подтипу H9.

В результате генетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Н была установлена принадлежность выделенного вируса к азиатской генетической

линии вируса низкопатогенного ГП подтипа Н9, точнее к генетической группе G1, представители которой распространены в странах Ближнего Востока. Согласно базе данных GenBank наиболее генетически близкими к выявленному изоляту являются вирусы гриппа А подтипа Н9N2, выделенные в Израиле в 2007 году и в России в 2019 году (97% сходства). К генетической группе G1 также относятся вирусы подтипа Н9N2, выделенные ранее на территории Российской Федерации в 2019-2023 гг. Изолят из Волгоградской области генетически близок к ВГП подтипа Н9N2, выявленному в этом же регионе в 2020 году (98% сходства).

Таким образом, в результате исследований проб биологического материала кур был установлен факт заражения домашних птиц вирусом Н9N2 в Волгоградской области.

С помощью комплексной диагностики, включающей молекулярные, серологические и вирусологические методы, определены некоторые биологические свойства выявленного в 2024 году в Волгоградской области вируса гриппа птиц подтипа Н9N2.

ЭКСТРАКТЫ КУЛЬТИВИРУЕМОГО МИЦЕЛИЯ НЕМАТОФАГОВОГО ГРИБА *DUDDINGTONIA FLAGRANS*, ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Проценко М.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Теплякова Т.В.

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

В наше время одной из важнейших задач медицины и фармации является борьба с вирусными инфекциями. Среди огромного количества возбудителей особое место принадлежит вирусам гриппа и герпеса. Одной из главных проблем профилактики и лечения вирусных инфекций является высокая скорость изменчивости многих вирусов вследствие быстропротекающих мутаций, которые приводят к снижению эффективности применяемого препарата, что требует замены лекарства. Вот почему разработка новых противовирусных препаратов все еще остается актуальной. Перспективными в плане поиска новых источников биологически активных соединений, обладающих противовирусными свойствами, являются хищные грибы, такие как *Duddingtonia flagrans*.

Выращивание мицелия нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* F-882 осуществляли глубинным способом в 0,75 л колбах на круговой качалке при 180 об./мин, температуре 26-28°C, на питательной среде, содержащей мелассу и кукурузный экстракт. Из мицелия *Duddingtonia flagrans* получали сухие этанольные и водные экстракты, которые были исследованы на наличие противовирусной активности в отношении штаммов вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK и вирусов простого герпеса 1-го (штамм VR-3) и 2-го типа (штамм MS) в клетках Vero. В качестве критериев оценки противовирусного эффекта экстрактов использовали индекс селективности и индекс нейтрализации. Индекс селективности (SI) экстрактов рассчитывали как отношение 50 % цитотоксической концентрации (CC₅₀, мкг/мл) к 50 % вирус-ингибирующей (IC₅₀, мкг/мл) концентрации, которые были оценены с помощью колориметрического метода определения

оптической плотности раствора красителя (нейтральный красный), поглощенного живыми клетками в монослое. Данный метод основан на определении способности препаратов подавлять цитопатическое действие вируса в культуре клеток. Кроме этого изучали изменение инфекционности вируса гриппа штамм A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 и вируса простого герпеса 1 типа под действием этанольного экстракта гриба в монослое клеток. Индекс нейтрализации (ИН, lg) вирусов под действием этанольного экстракта рассчитывали как разницу между титрами вируса (lg ТЦД₅₀/мл) в контроле и опыте. Анализ содержания групп биологически активных соединений (белки, полисахариды, танины, катехины, флавонолы) в сухих экстрактах проводили с помощью комплекса физико-химических методов.

В результате проведенных исследований выявлено, что оба экстракта проявляли активность в отношении всех исследуемых вирусов. SI этанольного экстракта в отношении вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа составляли 20,0 и 10,0 соответственно, а в отношении штаммов вируса гриппа A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) составляли 14,3, 16,7 и 12,5 соответственно. В то же время SI водного экстракта в отношении простого герпеса 1-го и 2-го типа составляли 6,3 и 5,0, а в отношении субтипов вируса гриппа H1N1pdm09, H3N2 и H5N1 составляли 10,2, 13,4 и 11,3 соответственно. Следовательно, наиболее выраженную противовирусную активность проявляет этанольный экстракт гриба по сравнению с водным, что может быть обусловлено большим содержанием в нем таких биологически активных веществ, как белки, полисахариды, флавонолы, катехины, каротины или более эффективным их сочетанием. Далее, этанольный экстракт, как более активный, исследовали на способность к снижению инфекционности вирусов. ИН вируса гриппа A/(H1N1)pdm09 и вируса простого герпеса 1-го типа под действием этанольного экстракта составляли 4,0 и 5,0 lg соответственно.

Таким образом, этанольный экстракт культивируемого мицелия хищного гриба *Duddingtonia flagrans* может стать основой для разработки и создания эффективных и безопасных противовирусных препаратов.

ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОТИПОВ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ГРИППА А

**Рак А.Я.¹, Добровольская О.А.², Баженова Е.А.¹, Матюшенко В.А.¹, Прокопенко П.И.¹,
Елпаева Е.А.², Исакова-Сивак И.Н.¹**

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

Грипп является одной из наиболее распространенных и опасных респираторных инфекций в мире, последствия которой могут оказаться летальными – в первую очередь для иммунокомпрометированных лиц, пожилых людей и детей. Наиболее эффективным способом противодействия распространению гриппозной инфекции является вакцинопрофилактика. В связи с чрезвычайно высокой изменчивостью патогена весьма целесообразной представляется разработка универсальных вакцин на основе одного из

наиболее консервативных антигенов вируса гриппа – нуклеопротеина (NP). Несмотря на многочисленные предложенные прототипы NP-содержащих или несущих ген NP гриппозных вакцин, вопрос об идеальной платформе для их разработки до сих пор остается открытым.

В данной работе нами были получены три варианта прототипов гриппозных вакцин, содержащих NP компонент: рекомбинантный NP (rNP) белок вируса гриппа А штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9) бактериального происхождения, *in vitro* транскрибированная мРНК (mRNA NP) NP A/Anhui/1/2013 (H7N9) в комплексе с липосомами и живая гриппозная вакцина (ЖГВ), геном которой имеет формулу 5:3 и представлен сегментами штамма A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) за исключением сегментов, кодирующих гемагглютинин, нейраминидазу и NP (от штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9)). Прототипы вакцин использовали для внутримышечной (rNP, mRNA NP) или интраназальной (ЖГВ) иммунизации мышей линии BALB/c (15 мкг/животное (rNP), 5 мкг/животное (mRNA NP), 10^6 EID₅₀/животное (ЖГВ), двукратно с интервалом 21 день). Забор спленоцитов для анализа Т-клеточных ответов (IFN γ - и TNF α -секретирующих клеток эффекторной памяти с фенотипом CD4⁺/CD8⁺, CD62L⁻, CD44⁺ в ответ на стимуляцию очищенным вирусом «7:1»: A/PR/8/34 (H1N1), содержащим NP A/Anhui/1/2013 (H7N9)) и сбор образцов крови для ИФА на иммобилизованном rNP (2 мкг/мл) или вирусе «7:1» (16 А.Е.) проводили спустя 7 и 14 суток после 2-й иммунизации, соответственно. На 29-й день после 2-й иммунизации проводили заражение животных челлендж-вирусом «7:1» в дозе 5×10^6 EID₅₀. Сбор респираторных органов для последующего определения в них вирусной нагрузки по EID₅₀ и мониторинг массы тела животных проводили на 6-й день и до 14-го дня после челленджа, соответственно.

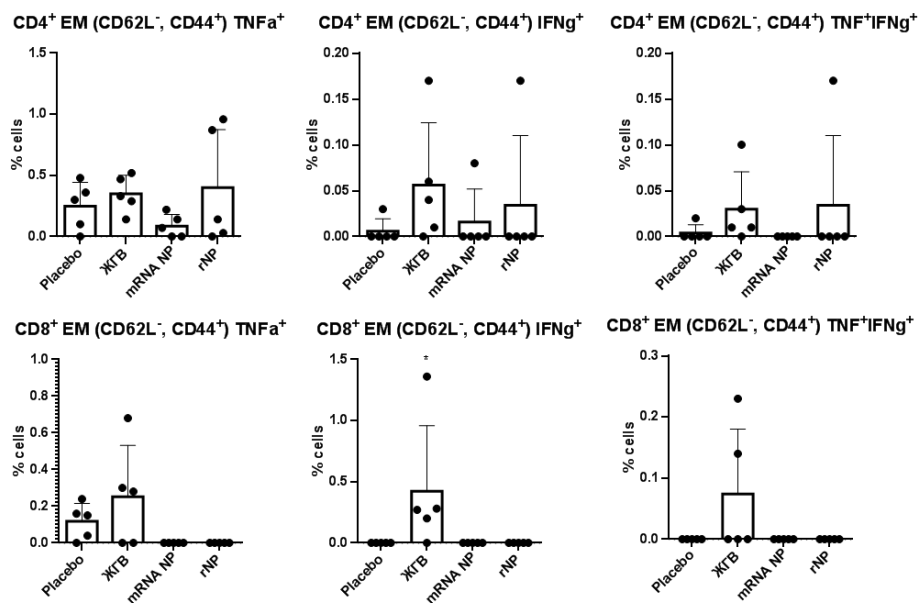
В результате выполнения исследования было установлено, что лишь вакцинация ЖГВ вызывает достоверное формирование CD8⁺ Т-клеток с фенотипом эффекторной памяти, активирующихся в ответ на стимуляцию челлендж-вирусом (Рисунок 1, А). При этом выраженное формирование специфических сывороточных антител, распознающих как иммобилизованный rNP, так и вирус «7:1», наблюдалось и при иммунизации ЖГВ, и при введении rNP (Рисунок 1, Б). Данный факт не только отражает иммуногенность прототипов rNP и ЖГВ, но и свидетельствует в пользу нативной природы rNP, полученного в бактериальной системе экспрессии.

Однако лишь введение ЖГВ обеспечивало защиту животных от летальной потери веса и практически полностью элиминировало вирусную нагрузку в их респираторных органах на 6-е сутки после челленджа (Рисунок 1, В, Г). Интересно, что при этом, в отличие от животных из всех других групп, предварительная вакцинация mRNA NP приводила к достоверному сохранению персистенции вируса в носовых ходах, однако не предотвращала его репликацию в нижних отделах дыхательных путей.

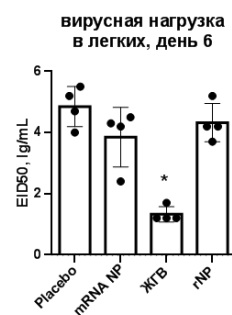
Таким образом, полученные нами данные отражают наибольшую эффективность доставки NP-антигена в организм в составе вакцинного вектора, что указывает на целесообразность разработки NP-содержащих векторных вакцин.

Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания № FGWG–2025–0015.

A

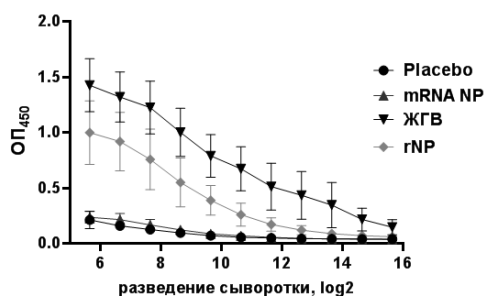


Г

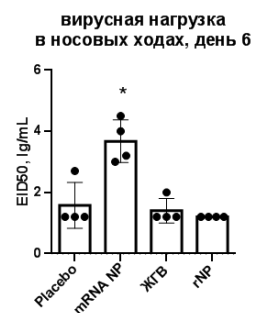
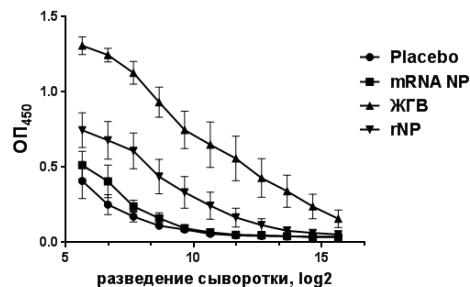


Б

Сывороточные IgG к rNP A/Anhui/1/2013 (H7N9)

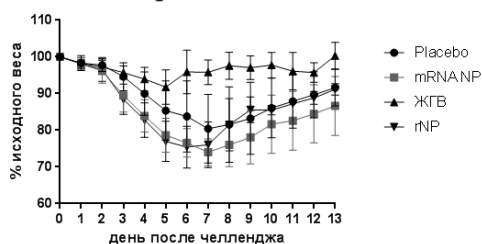


Сывороточные IgG к вирусу PR8-Anhui 7:1



В

Динамика веса мышей после челленджа
A/PR/8/34 (H1N1) + NP A/Anhui/1/2013 (H7N9) (7:1)
6.7 lg EID50/50 uL



Выживаемость мышей после челленджа
A/PR/8/34 (H1N1) + NP A/Anhui/1/2013 (H7N9) (7:1)
6.7 lg EID50/50 uL

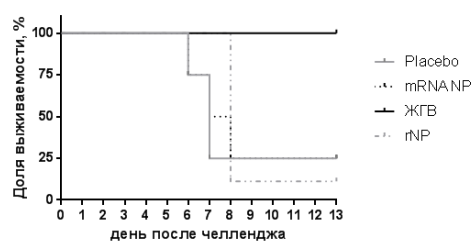


Рисунок 1 – Клеточные (А), гуморальные (Б) иммунные ответы, протективность (В) и ингибирование репликации челлендж-вируса в респираторных органах (Г) NP-содержащими вакцинами на основе рекомбинантного антигена (rNP), mRNA NP и ЖГВ. ОП₄₅₀ – оптическая плотность при длине волны 450 нм, * - p<0,05

ФОРМИРОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ В ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КИШЕЧНИКА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ

Родионова К.Н., Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Кудрявцев И.В., Исакова-Сивак И.Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Вакцинация является самым надежным способом борьбы против инфекционных заболеваний. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ), применяющаяся в нашей стране с 1987 года, позволяет формировать специфический и длительный иммунитет против различных штаммов вируса гриппа. ЖГВ формирует как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ на системном и локальном уровнях. В последние годы было показано, что иммунизация ЖГВ позволяет формировать тканерезидентные Т-клетки памяти непосредственно в месте введения вакцины – в дыхательных путях. Данное свойство позволило использовать ее как вектор для доставки эпитопов других вирусов в клетки-мишени, чтобы сформировать Т-клеточный иммунитет сразу к нескольким патогенам. Однако открытым остается вопрос о формировании иммунитета в других органах и возможности создания векторной вакцины на основе вируса гриппа для защиты против различных инфекций, в том числе кишечных.

Целью работы является изучение формирования локального Т-клеточного иммунного ответа в брыжейке толстого кишечника после интраназальной иммунизации живой гриппозной вакциной.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 18 самках мышей линии C57BL/6 в возрасте 2 месяцев массой 18-20 г. Все животные были разделены на три группы. Предметом исследования стали два штамма ЖГВ – с формулой генома 6:2, либо 5:3, различающихся источником гена NP. Он, как и гены HA и NA, был унаследован от эпидемического штамма А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1pdm), либо от донора аттенуации Лен17. Иммунизация животных производилась интраназально в дозе 6 Ig объемом 50 мкл двукратно с разницей в 21 день. Через неделю после второй иммунизации был проведен забор брыжейки толстого кишечника, селезенки и легких. Затем выделяли единичные клетки, которые стимулировали либо пептидами NP₃₆₆₋₃₇₄ (H2 и H1, соответственно). Далее пробы окрашивали антителами к поверхностным маркерам, в том числе к маркерам эффекторных (CD44+CD62L-) и тканерезидентных (CD69+CD103+) Т-клеток памяти, и внутриклеточному цитокину IFN γ . Для спленоцитов оценивался уровень полифункциональных Т-клеток эффекторной памяти (IFN γ +TNF α +IL-2+). Оценка субпопуляций клеток проводилась на проточном цитометре Beckman Coulter Navios, обработка результатов – в программе Kaluza Analysis Software.

Результаты. Изучение иммунного ответа на локальном уровне (в легких и брыжейке толстого кишечника) показало, что оба вакцинных штамма приводили к образованию высоких уровней IFN γ +CD8+ Т-клеток эффекторной памяти с фенотипом CD44+CD62L-, выявляемых при стимуляции соответствующим пептидом. При этом уровни IFN γ -продуцирующих эффекторных Т-киллеров, отвечающих на стимуляцию пептидом H1, были значительно выше в группе мышей, получивших ЖГВ 5:3, по сравнению с группой ЖГВ 6:2. Эти данные указывают на более выраженную способность ЖГВ 5:3, содержащей актуальный ген NP, защищать привитых от современных циркулирующих вирусов гриппа.

IFN γ -продуцирующие тканерезидентные Т-клетки в брыжейке не обнаруживались, тогда как в легких данная субпопуляция (CD69+CD103+) достигала 20% от всех IFN γ + эффекторных Т-киллеров. Следует отметить, что Т-клетки брыжейки имели более высокую фоновую

активацию по сравнению с клетками легких и селезенки, что указывает на стимуляцию данной лимфоидной ткани вследствие вторичной иммунизации.

При анализе клеточного ответа в селезенке в группе ЖГВ 5:3 выявлены повышенные относительно контрольной группы уровни полифункциональных вирусспецифических Т-киллеров в ответ на стимуляцию пептидом Н1.

Заключение. Таким образом, высокий уровень IFN γ -положительных эффекторных Т-клеток свидетельствует о наличии локального клеточного иммунитета в лимфоидной ткани кишечника в ответ на введение ЖГВ. Более перспективным вариантом ЖГВ для формирования устойчивого Т-клеточного ответа во всем организме, исходя из полученных данных, является штамм с формулой генома 5:3.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки РФ FGWG–2025–0015.

АКТУАЛЬНОСТЬ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВНОВЬ ВОЗНИКАЮЩИМ ПАТОГЕНАМ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СХЕМ ВАКЦИНАЦИИ (НА ПРИМЕРЕ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН)

Симакова Я.В.¹, Гуцин В.А.^{1,2}, Семенов Т.А.^{1,2}, Огаркова Д.А.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, Россия

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия

Глобальное распространение оспы обезьян, в том числе в странах, которые ранее не являлись эндемичными по этой инфекции, послужило основанием для ВОЗ объявить вспышку этого заболевания в 2022 году чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения международного значения. Такое решение потребовало организации постоянного мониторинга заболеваемости, разработки планов противодействия, расширения диагностических возможностей и использования специальных средств профилактики и лечения. Было высказано предположение, что ранее выработанный иммунитет к натуральной оспе может с высокой вероятностью защитить от заражения вирусом оспы обезьян (MPXV). Анализ результатов 16 ретроспективных перекрестных исследований показал, что продолжительность сохранения иммунной защиты у людей, которые ранее были вакцинированы против натуральной оспы, превысила 20 лет.

В связи с напряженностью современной ситуации, связанной с оспой обезьян, вопрос оценки достаточности уровня остаточного иммунитета к натуральной оспе представляет научный и практический интерес. Проведено серологическое тестирование на наличие IgG к MPXV образцов сывороток крови, полученных от взрослых добровольцев старше 30 лет (n>3000), с помощью разработанной собственной лабораторной тест-системы на основе твердофазного ИФА и протокола определения вируснейтрализующих антител (ВНА). Установлено, что частота встречаемости серопозитивных среди лиц в Москве в возрасте до 45 лет составила 10,8%, 46-65 лет - 51,6% и –и старше 66 лет - 66,8%, что

свидетельствует о наличии у них остаточного иммунитета к оспе. Распределение обследованных лиц на две основные возрастные группы и последующее их сравнение с использованием критерия хи-квадрата показало, что в когорте 30-45 лет иммунитет на уровне ВНА $\geq 1/20$ (протективный титр) был обнаружен в 5,4%, тогда как в когорте 46-80 лет - 46,4%. Анализ полученных данных говорит о сохранении иммунитета в отношении вируса осповакцины у обследуемых лиц с повышением возраста, что, вероятно, связано с обязательной вакцинацией против оспы в России до 1980 г. и дополнительной иммунизацией в Москве и Московской области в 1959-1960 гг. Установлено, что существует прямая корреляционная связь между данными, полученными методами ВНА и ИФА с применением разработанных наборов реагентов.

Наши расчеты, основанные на открытых данных о заболеваемости оспой обезьян в 2022 году, демонстрируют, что для прекращения циркуляции вируса МРХV среди населения по меньшей мере 50,25 – 65,28% населения должны обладать иммунитетом к оспе обезьян. Это вызывает обеспокоенность в связи с риском появления высокопатогенного варианта ортопоксвируса, обладающего эпидемическим потенциалом в результате естественной эволюции. В связи с этим существует острая необходимость в разработке вакцин, обладающих высокой эффективностью против ортопоксвирусов и, в частности, МРХV, а также низкой реактогенностью для защиты населения в случае распространения оспы обезьян среди жителей Москвы.

ИЗУЧЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА В РАМКАХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА

Солошенко А.К., Шмелев А.А., Фомина С.Н., Никифоров В.В.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

В 2002 г. сотрудники биотехнологической компании Neotropix Inc. (США) обнаружили в культуре клеток ретинобластомы человека (PER.C6) вирус-контаминант, идентичный, выделенному от свиней в 1988 г., но отличающийся от других известных пикорновирусов. Полученные данные явились основанием для заключения, что контаминация культуры клеток могла произойти с фетальной сывороткой крупного рогатого скота или свиным трипсином. В последующем этот возбудитель был обнаружен в пробах стенок везикул и везикулярной жидкости, полученных от свиней. В настоящее время выделенный возбудитель является единственным репрезентативным штаммом вида Senecavirus A, рода Senecavirus, семейства Picornaviridae. Исследования вируса позволили идентифицировать его, как мощный онколитический вирус против опухолей нейроэндокринного происхождения. Сенекавирус А имеет возможность нацеливаться и проникать в солидные опухоли, не обладает способностью к инсерционному мутагенезу, а также является самореплицирующимся РНК-вирусом с селективным тропизмом к раковым клеткам. При культивировании возбудителя в монослое клеток было установлено, что вирус не инфицирует клетки здорового человека, но при этом способен инфицировать клетки определенных опухолей, в том числе мелкоклеточного рака легких, самого распространенного из легочных неоплазий человека. Все эти данные послужили основанием для характеристики выделенного возбудителя как «онколитического» вируса.

Для ФГБУ «ВНИИЗЖ» изучение Сенекавируса А представляет интерес в рамках дифференциальной диагностики ящура - особо опасной болезни, в связи со сходными клиническими признаками болезни, вызывающей везикулярные поражения у сельскохозяйственных животных. В настоящее время, согласно литературным данным, доказано, что к Сенекавирусу А восприимчивы свиньи и крупный рогатый скот.

Болезнь была описана в Австралии, Северной Америке и Европе, но недавние сообщения из Бразилии и США свидетельствуют о росте распространенности вируса среди свиней в данных странах. В связи с тем, что клинические признаки болезни, вызванные Сенекавирусом А, неотличимы от ящура данная инфекция входит в официальный перечень заболеваний Всемирной Организации Здоровья Животных (WOAH). Несмотря на то, что в Российской Федерации отмечается устойчивый прирост поголовья свиней, импорт племенных свиней продолжает осуществляться, соответственно существует вероятность риска заноса возбудителя из других стран. В этой связи возникает необходимость изучения и контроля сенекавирусной инфекции, разработки методов диагностики для идентификации возбудителя в рамках дифференциальной диагностики ящура.

С целью изучения вируса были проведены опыты по воспроизведению инфекции на свиньях и получению референтных сывороток для разработки и валидации диагностических тест-систем.

Заражение поросят вирусосодержащим материалом проводили интрадермально в венчик копыт передних и задних конечностей. Контрольному животному вирус не вводился. После заражения явных клинических признаков, описанных в литературе, у свиней не наблюдалось. Через 52 часа у всех подопытных животных отмечалось незначительное повышение температуры. Полученные сыворотки крови исследовали в реакции микронеutralизации. Результаты показали появление у свиней антител к Сенекавирусу А на 3 день после заражения. У контрольного (контактного) животного антитела были обнаружены на 8 день после заражения.

С целью получения гипериммунной сыворотки крови, зараженных животных внутримышечно иммунизировали смесью из очищенного, инаktivированного антигена на 19 день после инфицирования. Кровь от иммунизированных животных отбирали на 21 сутки после иммунизации. Исследование на наличие антител в полученной сыворотке крови проводили в реакции микронеutralизации.

В ходе экспериментальной работы по воспроизведению инфекции, вызванной Сенекавирусом А, было установлено, что вирус репродуцируется в организме свиней без видимых клинических признаков с образованием специфичных, противовирусных антител. Обнаружение антител у контактного животного позволяет сделать вывод о выделении вируса в окружающую среду при репродукции в организме инфицированных животных.

ДНК-ВАКЦИННЫЕ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩИЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА КЭ, ИНДУЦИРУЮТ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Тигеева Е.В., Яковлев В.А., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Вахитов Д.И., Макарова К.П., Кисаков Д.Н., Рудометова Н.Б., Рудометов А.П., Карпенко Л.И.

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

Вирус клещевого энцефалита (КЭ) обладает высокой патогенностью, способен поражать центральную нервную систему, приводя к тяжелейшим хроническим последствиям либо летальному исходу. Единственной эффективной мерой борьбы с КЭ является профилактическая вакцинация, которая доказала свою эффективность. Лицензированные вакцины на основе инактивированного вируса способны формировать высокий уровень иммунной защиты у человека, однако имеют ряд недостатков: сложный график вакцинации, относительно высокая реактогенность, сложность производства и хранения; кроме того, встречаются случаи прорывных инфекций у вакцинированных.

Широкое распространение вируса и активный рост числа заболевших стимулировали интерес к разработке новых вакцин против КЭ. В последнее время активно развиваются платформы, основанные на использовании нуклеиновых кислот – ДНК- и мРНК-вакцины. Внутриклеточная экспрессия антигенов, кодируемых вакцинами на основе нуклеиновых кислот, позволяет обеспечить нативную структуру белков благодаря посттрансляционным модификациям. Технология производства таких вакцин не требует сложных манипуляций или работы с опасными патогенами, что значительно облегчает процесс их создания и снижает его общую стоимость. Кроме того, считается, что применение таких вакцин является более безопасным по сравнению с традиционными подходами.

Целью данной работы стала разработка ДНК-конструкций, кодирующих различные сочетания поверхностных белков вируса КЭ – ргМ и Е, а также анализ их иммуногенных свойств.

Для получения ДНК-вакцинных конструкций, способных индуцировать гуморальное звено иммунитета, были выбраны поверхностные белки вируса КЭ – Е, как основной иммуноген вируса КЭ, и ргМ, поскольку он также несет на себе небольшую часть эпитопов для вируснейтрализующих антител. Для дизайна генов, кодирующих последовательности структурных белков вируса КЭ были выбраны следующие последовательности – *prM*, *E* без трансмембранного якоря - *Edel*, и последовательность полноразмерного белка - *E*.

Гены были синтезированы и клонированы в составе вектора pVAX1. Полученные конструкции получили название - pVAX-ргМ-Е, pVAX-ргМ-Edel, pVAX-Edel.

Для исследования иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцинных конструкций трем опытным группам животных (по 6 животных) с помощью метода безыгольной струйной инъекции вводили pVAX-ргМ-Е, pVAX-ргМ-Edel, pVAX-Edel. В качестве отрицательного контроля выступала группа интактных животных. Группа животных, которой вводили коммерческую вакцину «Клещ-Э-Вак», представляла собой положительный контроль. Иммунизацию мышей проводили дважды на 0 и 21 дни.

Результаты ИФА показали, что высокий титр антител был отмечен в сыворотке мышей, иммунизированных ДНК-вакцинной конструкцией pVAX-ргМ-Е и вакциной Клещ-

Э-Вак (1:12150). В группах животных, иммунизированных pVAX-prM-Edel и pVAX-Edel, уровень антител был несколько выше, чем в группе неиммунизированных животных, однако такие различия не являются статистически достоверными.

Анализ Т-клеточного иммунного ответа проводили с помощью ELISpot через 10 дней после второй иммунизации. Было показано, что в группах мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAX-prM-E, pVAX-prM-Edel, pVAX-Edel, наблюдался высокий уровень спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов из белка Е вируса КЭ (335, 349 и 398 SFU/10⁶ клеток соответственно). В контрольных группах животных, иммунизированных вакциной Клещ-Э-Вак и pVAX1, клеточный ответ был на уровне фона.

Таким образом, показано, что ДНК-вакцина pVAX-prM-E индуцирует формирование вирус-специфического гуморального ответа (данные ИФА), сопоставимые с уровнем ответа, вызываемого в ответ на введение вакцины Клещ-Э-Вак. Анализ Т-клеточного ответа методом ELISpot показал способность всех полученных конструкций вызывать высокий уровень IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов белка Е.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ВИРУСНЫЕ КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ В СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ ДИАРЕЙ

Туйчиев Л. Н., Рахимов Р. Р., Миркасымова Х. Х., Рузметова С. И., Мухамедова Н. М.

Научно-исследовательский институт Вирусологии РСНПМЦЭИМИИП, г. Ташкент, Узбекистан

Цель исследования. Изучить этиологическую структуру острой диареи.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 176 пациентов в возрасте от 1 месяца до 43 лет с диагнозом «острая диарея». В качестве биологического материала использовались образцы кала, собранные в стерильные контейнеры в течение 1–3 дней с момента начала заболевания и хранившиеся при температуре –20°C до проведения анализа. Анализ осуществлялся с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени для выявления ДНК (РНК) норовирусов, ротавирусов, астровирусов, аденовирусов, а также бактерий: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. и *E. coli*.

Критерии включения. Пациенты с острой кишечной инфекцией, характеризующейся прохождением трёх и более жидких стулов в течение 24 часов, при которых была проведена госпитализация, способные предоставить образец кала в первые 48 часов пребывания в стационаре для тестирования на ротавирус.

Критерии исключения: пациенты, у которых диарея продолжалась более 7 дней до поступления в больницу, неспособные предоставить образец кала в период госпитализации, а также лица с хроническими заболеваниями ЖКТ, принимавшие антибиотики в течение 10 дней до госпитализации.

Результаты и обсуждение. Из 176 обследованных пациентов 73 оказались ПЦР-положительными, что составляет примерно 41,5%. Наиболее часто выявляемыми вирусными патогенами были норовирус (32,9%) и ротавирус (27,4%), в то время как астровирус (1,4%) и аденовирус (2,7%) встречались реже. Среди бактериальных патогенов были обнаружены *Campylobacter* (6,8%), *Salmonella* spp. (4,1%) и *Shigella* spp. (4,1%). Также зафиксированы случаи смешанных инфекций: ротавирус + астровирус (1,4%), ротавирус + норовирус (12,3%), ротавирус + *Campylobacter* (2,7%), норовирус + *Campylobacter* (2,7%) и аденовирус + астровирус + норовирус (1,4%).

Заключение. Норовирус и ротавирус являются наиболее распространёнными патогенами среди обследованных пациентов. Значительное присутствие бактериальных патогенов, таких как *Campylobacter*, *Salmonella* spp. и *Shigella* spp., а также случаи смешанных инфекций подчёркивают необходимость комплексного подхода к диагностике и лечению.

ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА FM08

Фалалеева Д.А.¹, Плотникова М.А.², Клотченко С.А.²

¹*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), г. Санкт-Петербург, Россия*

²*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Вирус гриппа, благодаря высокой изменчивости своих поверхностных гликопротеинов — гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА) — ежегодно вызывает сезонные вспышки заболевания, что требует разработки новых подходов к созданию эффективных средств профилактики и лечения. Универсальные антитела, распознающие и нейтрализующие различные штаммы вируса гриппа обладают высоким терапевтическим потенциалом. Исследуемое рекомбинантное антитело FM08 (MEDI8852) является иммуноглобулином IgG1-изотипа, способным специфично связываться с головным участком НА, препятствуя изменению его конформации, необходимой для слияния липидной оболочки вируса с мембраной эндосомы клетки и высвобождения инфекционных частиц.

Целью настоящего исследования являлась оценка специфической и вируснейтрализующей активностей антитела FM08, выявляющего НА вирусов гриппа А обеих филогенетических групп.

Материалы и методы. Ранее в культуре эукариотических клеток с использованием двух плазмидной экспрессионной системы нами было накоплено рекомбинантное антитело FM0 и проведена его очистка методом аффинной хроматографии.

Анализ специфичности полученного рекомбинантного антитела проводили методом «сэндвич»-ИФА. Для этого вирусы гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2, принадлежащие к первой и второй филогенетическим группам, соответственно, иммобилизовали в лунках планшета, далее вносили анализируемое антитело FM08 в различных концентрациях.

Детекцию осуществляли антителами против иммуноглобулинов человека, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Вирус-нейтрализующая активность FM08 была исследована в реакции микронейтрализации. Для этого линейку разведений антитела FM08 смешивали с вирусами гриппа в дозе ТЦИД₁₀₀, инкубировали в течение часа и вносили к монослою клеток MDCK. Клетки инкубировали в термостате в течение 72 ч при 37°C. Затем оценивали продукцию вирусов в клеточной среде реакцией гемагглютинации (РГА).

Результаты. Согласно полученным нами результатам (рис. 1А), рекомбинантное антитело FM08 обладало перекрестной реактивностью как в отношении штаммов гриппа подтипа H1N1pdm, так и подтипа H3N2, относящимся к обеим филогенетическим группам. При этом, насколько можно судить по данным твердотельного ИФА, аффинность связывания FM08 с НА первой филогенетической группы (клады H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16) была несколько выше, чем с НА второй группы.

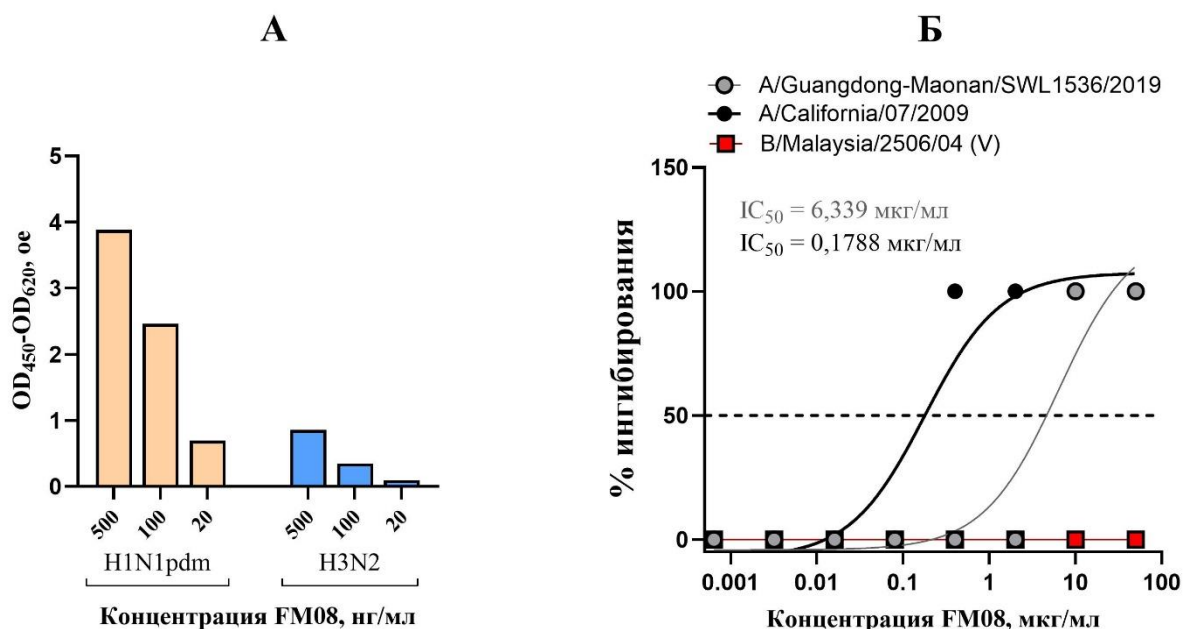


Рисунок 1 – А) Анализ специфичности связывания FM08 методом ИФА; Б) Нейтрализующая активность FM08

Чтобы оценить протективный противовирусный потенциал мы измерили нейтрализующую активность FM08 против штаммов гриппа A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1pdm), A/California/07/2009 (H1N1pdm), а также B/Malaysia/2506/04 (V). Как показано на рисунке 1Б антитело FM08 было неспособно нейтрализовать вирусы гриппа подтипа Б. Однако, FM08 проявляло нейтрализующую активность в отношении вирусов подтипа H1N1pdm. Рассчитанные показатели IC₅₀ для этих штаммов гриппа составили 0,18 и 6,3 мкг/мл.

СЛУЧАЙ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Фаттахлы Г.Г., Роганова И.В.

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, г. Самара, Россия

В XXI веке в связи с ростом миграционных процессов, урбанизацией, изменением климата особую актуальность приобретают вирусные инфекции, в частности, лихорадка Западного Нила (ЛЗН), представляющая значимую угрозу общественному здоровью.

В Российской Федерации в 2023 году выросла регистрация ЛЗН: 195 случаев, в 2022 году – 33, в «доковидный» период рост был незначительным (8,3 %). ЛЗН регистрируют в Краснодарском крае, Ростовской, Волгоградской области. Особенности эпидпроцесса 2023 г.: длительность – май-ноябрь; расширение климатогеографических зон: Северный Кавказ, Западная Сибирь, ДНР, Запорожская, Ивановская, Костромская, Оренбургская, Пензенская области, Башкортостан, Ингушетия, Кабардино-Балкария, Казахстан, Киргизия, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Чечня, Чувашия. В 2018, 2020-2022 гг. ЛЗН в Самарской области не регистрировалась, в 2019 и 2024 гг. отмечены по 2 случая.

Вирус ЛЗН относится к роду *Flavivirus*. Восприимчивость человека очень высокая.

Резервуары: птицы водно-околоводного комплекса, млекопитающие, домашние и синантропные птицы. Основные переносчики — комары рода *Culex*, *Aedes*. В умеренном климате характерна летне-осенняя сезонность.

Патогенез ЛЗН изучен мало. Доказаны вирусемия, генерализованное поражение сосудов. Вирусы реплицируются в цитоплазме эндотелия, проникают в оболочки и вещество мозга. Страдают сердце и другие органы.

Инкубационный период: от 2 дней до 3 недель. Выделяют лихорадочную, менингеальную, менингоэнцефалитическую формы.

Под наблюдением был пациент Б., 27 лет.

Заболел 14.08.24 г.: появились кашель со слизистой мокротой, головные боли, температура тела 39 °С. Лечился самостоятельно. 25.08.24 г. температура 40,1 °С, госпитализирован с диагнозом «острый ринофарингит». Лабораторных изменений не выявлено. Исследования на ГЛПС, герпес-вирусы отрицательные; Ig М к вирусу ЛЗН положительный. Выписан 05.09.24 г. с выздоровлением. 07.09.24 г. температура тела поднялась до 37,5 °С. 16.09.24 г. госпитализирован с диагнозом «Лихорадка неясного генеза». Жалобы: температура тела 38 °С, слабость, потливость, чувство жара, кашель со слизистой мокротой, головные боли, ломота в теле и суставах. Эпиданамнез: живет в Тольятти, выезжает на дачу.

Объективно: Температура тела 37,2 °С. Состояние средней степени тяжести. Сознание ясное. Кожа физиологической окраски, повышенной влажности. Сыпи, отеков нет. Менингеальных, очаговых симптомов нет. Слизистая ротоглотки гиперемирована. Миндалины рыхлые, налетов нет. Нижнечелюстные лимфоузлы увеличены. Дыхание везикулярное. ЧДД=18, SpO₂=98 %. Тоны сердца ясные. ЧСС - 70, АД – 140 и 70 мм рт ст. Язык влажный, белый налет. Живот мягкий, безболезненный. Симптомы раздражения брюшины отрицательные. Печень, селезенка не увеличены. Область почек, диурез без изменений.

Кровь: Лейкоциты $10.08 \times 10^9/\text{л}$, Тромбоциты $100 \times 10^9/\text{л}$, Эозинофилы 6.7 %, АлАТ 90.5 Ед/л, АсАТ 37.1 Ед/л, Глюкоза 6.5 ммоль/л. Моча без изменений. Не обнаружены ДНК герпес-вирусов 1, 2, 4, 5 типа в крови, слюне; Ig М к вирусу ЛЗН положительный.

КТ грудной клетки: правосторонняя среднедолевая пневмония.

УЗИ: диффузные изменения печени, поджелудочной железы (липоматоз), паренхимы почек.

Лечение: Эуфиллин, Левофлоксацин, Аскорбиновая кислота, Рибоксин, Омепразол.

Диагноз: Основное заболевание: Лихорадка Западного Нила, средней тяжести. Осложнение: Правосторонняя среднедолевая пневмония, нетяжелое течение. ДН0. Сопутствующие заболевания: Неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз. Выписан с выздоровлением. Случай признан местным.

Вывод: ЛЗН расширяет свой ареал, повышаются риск и случаи местного заражения. Клиническая картина неспецифична, требует дифференциальной диагностики. Следует обследовать пациентов в теплое время года с катаральными и симптомами поражения ЦНС на ЛЗН. Учитывая широкое распространение, потенциальную тяжесть заболевания распространения ЛЗН, важными задачами общественного здравоохранения являются разработка эффективных методов ее профилактики и контроля.

ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА В/RHODE ISLAND/01/2019

Флорен А.М.^{1,2}, Ажойчик Е.В.², Большакова М.В.², Царева Т.Р.², Сорокин Е.В.²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

Вирус гриппа типа В является одним из наиболее значимых возбудителей острых респираторных заболеваний. Известно, что основной поверхностный белок вируса гриппа В, индуцирующий выработку вируснейтрализующих антител – гемагглютинин, претерпевает непрерывные изменения по типу антигенного дрейфа, обусловленные мутациями в тяжелой субъединице гемагглютинина (ГА1). До недавнего времени вирус гриппа В был представлен двумя социркулирующими эволюционными линиями – Ямагатской и Викторианской, но начиная с марта 2020 года вирусы, принадлежащие к Ямагатской ветви, выделены не были.

В задачу настоящего исследования входила разработка моноклональных антител (МКА), направленных к ГА1 вирусов гриппа В Викторианской линии, с последующим получением эскейп-мутантов (ЭМ) вируса и идентификацией иммунодоминантных эпитопов в составе молекулы гемагглютинина.

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева были получены 12 гибридом – продуцентов МКА к вирусу гриппа В/Rhodes Island/01/2019, принадлежащему к Викторианской эволюционной линии.

Установлено, что все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (10^{-6} – 10^{-7}) только с вирусами гриппа В Викторианской линии, при полном отсутствии

взаимодействия с сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А субтипов (H1N1)pdm09, H2N2, H3N2, H5N1, H7N9 и H9N2. МКА обладали антигемагглютинирующей активностью в отношении современных вирусов гриппа В 2019 – 2025 гг. выделения, а также выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении вируса-иммуногена B/Rhode Island/01/2019, что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса.

Все МКА панели были использованы для получения эскейп-мутантов вируса B/Rhode Island/01/2019. Для получения ЭМ 10-дневные куриные эмбрионы заражали смесью штамма-иммуногена с моноклональным антителом. Через 72 часа производили сбор аллантоисной жидкости после чего исследовали способность полученных ЭМ реагировать с гомологичными и гетерологичными МКА в РТГА. Далее ЭМ клонировали 3-4 раза методом предельных разведений. Полученные ЭМ обозначали в соответствии с названием МКА, использованных для их селекции.

По результатам секвенирования гена гемагглютинина ЭМ были идентифицированы аминокислотные замены в основных антигенных сайтах GA1:

1. Петля-120 (замены H122→R и H122→N)
2. Петля-160 (замена N163→S, данная замена приводит к исчезновению потенциального сайта N-гликозилирования)
3. Спираль-190 (замены D194→Y, D194→V, Q197→K, Q197→R и K200→N)
4. Петля -240 (замены G235→E и S240→R)
5. ЭМ 7H1 имел замену E48→K. Антигенная детерминанта гемагглютинина вирусов гриппа В в положении 48 по современной классификации не входит ни в один из антигенных сайтов.

Таким образом, выполненные исследования дали возможность четко локализовать иммунодоминантные эпитопы в составе молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии, ответственные за выработку вируснейтрализующих антител. Аминокислотные замены в ряде положений ранее описаны не были, что расширяет представления об антигенно значимых детерминантах в составе гемагглютинина современных вирусов гриппа типа В.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА ВЫДЕЛЕННОГО У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ В Г. ЕКАТЕРИНБУРГЕ

Чернышева А.Е.¹, Короткова И.А.¹, Пузанов З.С.², Маркарян А.Ю.¹

¹ФБУН ФНИИВИ Виром Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

²ФГАОУ ВО «СПбПУ», г. Санкт-Петербург, Россия

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) является одним из ключевых этиологических факторов, способствующих развитию тяжелых острых респираторных инфекций, и наибольшее бремя РСВ-инфекции приходится на младенцев и детей раннего возраста. Понимание генетического разнообразия этого вируса имеет важное значение для разработки эффективных стратегий профилактики, диагностики и лечения.

Методы: Исследование проводилось на базе лаборатории респираторных вирусных инфекций ФНИИВИ Вирусом Роспотребнадзора. Образцы из носоглотки были получены от госпитализированных детей в городской клинической больнице № 8 г. Екатеринбурга после получения письменного согласия на проведение исследования. Сбор образцов осуществлялся в период с октября 2023 года по март 2024 года включительно. Детекция респираторно-синцитиального вируса проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Генотипирование выполнялось методом Сэнгера.

Результаты: Методом фрагментного секвенирования генотипировано 67 положительных по ПЦР образцов, в результате 56 идентифицированы как генотип hRSV-A, 11 - как hRSV-B. По классификации Nextstrain все hRSV-A по структуре G-гена принадлежали к G -кладе GA2.3.5. Этот кластер, в свою очередь, делится на несколько подкластеров, среди которых наибольшее представительство имеет кластер A.D.1, составивший 78,6% от общего числа образцов. Остальные клады представлены следующим образом: 5,4% составляют образцы AD, 7,1% - A.D.3, 3,6% - A.D.3.1, 1,8% - A.D.5 и 3,6% - A.D.5.1

В соответствии с классификацией Nextstrain, все 11 образцов hRSV-B были отнесены к G-кладе GB5.0.5a, а также к подкладам B.D.E.1 и B.D.4.1.1. Примечательно, что преобладающей среди них оказалась клада B.D.E.1, составившая внушительные 81,8% от общего числа образцов. В то же время, клада B.D.4.1.1. была представлена в меньшей степени, составив лишь 18,2%. Эти данные подчеркивают доминирование клады B.D.E.1 в исследуемой выборке.

В исследуемой когорте средний возраст составил 2 года. Наиболее часто отмечаемыми симптомами были: лихорадка, наблюдаемая у 88,1% больных (59 из 67), кашель - у 83,6% (56 из 67), заложенность носа - у 58,2% (39 из 67) и общее недомогание - у 56,7% (38 из 67). Анализ данных показал, что у 9,4% больных (14 из 67) имелись сопутствующие инфекции, вызванные такими патогенами, как SARS-CoV-2, грипп А (H3N2), hRv, hBov, hCov и hPiv 1/3. Другие респираторные вирусы, включая грипп А (H1N1), грипп В, hAdV, hMpv и hPiv 1/3, были включены в сбор метаданных, однако в данной выборке они не были обнаружены. Кроме того, коинфекции в образцах с положительным результатом на RSV-A/B не выявлены.

Результаты свидетельствуют, что в эпидемиологический сезон 2023-2024 гг. респираторно-синцитиальная инфекция была относительно широко распространена среди госпитализированных детей, с доминированием G -клады GA2.3.5. Это может быть связано с более высоким уровнем изменчивости и дивергенции данного вируса. В то же время, ограниченная изменчивость вирусов группы В может способствовать их длительному распространению, что приводит к тому, что вирусы группы А чаще преобладают над вирусами группы В.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФНИИВИ «Вирус» Роспотребнадзора (рег. № НИР 121041500044-2).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА СВИНЕЙ (PHEV) В РОССИИ

Шайтарова Е.Б.^{1,2}, Мусаева Т.Д.¹, Ёлшин Н.Д.¹, Комиссаров А.Б.¹

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней (PHEV) – коронавирус, поражающий пищеварительную и центральную нервную систему новорожденных поросят. Данный вирус принадлежит к подроду *Embecovirus*, роду *Betacoronavirus* и семейству *Coronaviridae*.

Помимо гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита к свиным коронавирусам также относятся: вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV), респираторный коронавирус свиней (PRCV), вирус эпизоотической диареи свиней (PEDV) и дельтакоронавирус свиней (PDCoV). Вирусы TGEV, PEDV и PRCV принадлежат роду *Alphacoronavirus*, PDCoV – *Deltacoronavirus*, соответственно. В отличие от остальных представителей коронавируса свиней, PHEV является единственным известным на сегодняшний день коронавирусом, который может вызывать нейротропную инфекцию у свиней. Помимо энцефаломиелита PHEV вызывает синдром рвоты и истощения. У особей, чей возраст больше 4 месяцев вызывает только субклиническую инфекцию.

В 2023 г. в Китае был обнаружен новый респираторный вариант гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита *gvPHEV*: в отличие от PHEV, новый вариант вызывает только респираторные симптомы, не вызывая неврологических нарушений.

Геном вирусов подрода *Embecovirus* помимо основных 16 неструктурных (nspl-nspl6) и 6 структурных белков, присущих роду *Betacoronavirus*: гемагглютинин-эстеразы (HE), шиповидного белка (S), белка оболочки (E), мембранного белка (M), и нуклеопротеида (N), кодирует NS2 белок, являющийся антагонистом противовирусного фактора РНКазы L..

Респираторный вариант гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита (*gvPHEV*) в отличие от PHEV имеет либо полную делецию NS2 гена, либо преждевременный кодон терминации, в связи с чем не способен кодировать функциональный белок.

Цель исследования. Разработать протокол полногеномной амплификации гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита свиней (PHEV).

Материалы и методы. В работе было проанализировано 877 респираторных образцов, собранных в 2024 г. от свиней с ферм Европейской части России, на наличие PHEV.

Экстракцию нуклеиновой кислоты проводили с помощью набора NAmagp2000 (Биолабмикс), «МагноПрайм ФАСТ-Р» с использованием автоматических станций Auto-Pure96 (Allsheng). Детекцию нуклеиновой кислоты бетакоронавирусов проводили с помощью праймеров и зондов CDC. В качестве реагентов для постановки PCR использовали набор БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×). Дизайн праймерной панели для полногеномной

амплификации (WGA) проводили с помощью веб-инструмента PrimalScheme. Амплификацию проводили с использованием реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×).

Для подготовки ДНК-библиотек использовали набор реагентов MGIEasy Fast PCR-Free FS Library Prep Set (MGITech, China). Секвенирование проводилось на приборе DNBSEQ-G400 (MGITech, Китай) с использованием наборов DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set FCL SE100.

Прочтения были выравнены на референсную последовательность с помощью программы BWA-MEM 2, выравнивания конвертировали в программе Samtools. Консенсусную последовательность получали с помощью программы Unipro Ugene v45. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовался алгоритм MAFFT. Построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (ML, GTR+G) проводили в программе RAxML, полученные деревья визуализировали в программе FigTree.

Результаты. 137 из 877 респираторных образцов (15%) оказались положительными на *Betacoronavirus*. Для 3 образцов была проведена полногеномная амплификация и секвенирование. После сборки геномов был проведен сравнительный анализ полученных геномов (WD1168, WD1271, WD2312) на соответствие штамму гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита свиней. Сравнив полученные последовательности с геномами PHEV из GenBank, было определено, что отсеквенированные образцы относятся к новому респираторному варианту гемагглютинирующего вируса энцефаломиелита (rvPHEV) и имеют наибольшее родство со штаммом, циркулировавшим в Китае, провинции Фуцзянь в апреле 2021 года.

Выводы. По результатам ПЦР-скрининга установлено, что rvPHEV широко циркулирует среди свиней на территории Европейской части в России в настоящий момент. Впервые в России было проведено полногеномное секвенирование вируса PHEV и идентифицирована его респираторная рекомбинантная форма rvPHEV. Данные готовятся к депонированию в GenBank.

КРОСС-ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИРУСА ГРИППА В С УКОРОЧЕННЫМ БЕЛКОМ NS1

***Шамакова Д.А., Шуклина М.А., Ожерельева О.О., Шурыгина А.П.-С.,
Сергеева М.В., Стукова М.А.***

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

В настоящее время самыми распространенными вакцинами против гриппа являются инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ), которые характеризуются достаточно высокой эффективностью в предотвращении заболеваемости и смертности от гриппа. В то же время отмечается крайне низкая защитная эффективность ИГВ в случае несоответствия вакцинных штаммов циркулирующим вирусам гриппа. В отличие от ИГВ, живые гриппозные вакцины (ЖГВ) способны вызывать комплексный иммунный ответ к вирусным антигенам, однако их иммуногенность в отношении консервативных последовательностей

недостаточна для развития полноценного эффекта кросс-специфичной защиты. Фактором, ограничивающим иммуногенность ЖГВ, является экспрессия вакцинными штаммами полноценного иммуносупрессорного белка NS1, подавляющего врожденный и специфический иммунный ответ. Ранее мы сконструировали аттенуированный вирус гриппа B/Lee/NS1ΔC с укороченным белком NS1 и показали его безопасность и иммуногенность на мышинной модели.

Цель настоящего исследования – изучение кросс-протективного действия интраназальной иммунизации вирусом гриппа В с укороченным белком NS1 в ходе экспериментальной гриппозной инфекции.

Эксперимент проводили на мышах линии C57BL/6. Первую группу животных интраназально однократно прививали штаммом B/Lee/NS1ΔC в дозе 6.0 lg ЭИД₅₀. Вторую группу иммунизировали внутрибрюшинно двукратно прототипом ИГВ, содержащим 15 мкг НА штамма B/Austria/1359417/2021 (линия Виктория). Третья группа являлась контролем заражения, четвертую группу составляли интактные животные. После иммунизации оценивали формирование гуморального ответа методом РТГА и Т-клеточного ответа в легких методом проточной цитометрии. Через 4 недели после начала эксперимента животных заражали вирусом гриппа B/Phuket/3073/2013 (линия Ямагата) в сублетальной дозе 1 МЛД₅₀. В ходе инфекции определяли вирусную нагрузку в легких методом титрования бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ) в культуре клеток MDCK, а также оценивали популяции клеток врожденного и адаптивного иммунитета в ткани легких.

Иммунизация штаммом B/Lee/NS1ΔC и прототипом ИГВ, вызывали формирование антигемагглютинирующих антител к соответствующим гомологичным, но не к гетерологичному вирусам. При этом интраназальная иммунизация штаммом B/Lee/NS1ΔC вызывала формирование Т-клеточного ответа в легких животных как к гомологичным, так и к гетерологичному вирусам гриппа В.

Заражение иммунизированных животных вызвало существенную потерю массы тела в контрольной группе и группе ИГВ, в то время как мыши, привитые штаммом B/Lee/NS1ΔC, практически не худели. На 4-е сутки после заражения у мышей, привитых штаммом ИГВ, отмечено снижение вирусной нагрузки на 1.5 lg по сравнению с контрольными животными, при этом в группе B/Lee/NS1ΔC, отмечено полное подавление вирусной репликации. Оценка врожденного иммунного ответа показала развитие воспалительной реакции в легких всех зараженных животных, выраженное в повышении содержания интерстициальных макрофагов, моноцитов и нейтрофилов на 4-й день инфекции. У животных, иммунизированных штаммом B/Lee/NS1ΔC, воспалительный процесс носил кратковременный характер – к 6-му дню инфекции показатели были на уровне интактных мышей, в отличие от групп контроля заражения и ИГВ, где воспаление продолжалось. Только в группе мышей, вакцинированных штаммом B/Lee/NS1ΔC, наблюдали раннее развитие адаптивного клеточного T_H1 ответа к челлендж-вирусу в легких с преобладанием монофункциональных CD4⁺ и CD8⁺ T_H1 клетки, экспрессирующих IFN γ .

Проведенное исследование демонстрирует кросс-защитное действие интраназальной иммунизации штаммом B/Lee/NS1ΔC по сравнению с прототипом ИГВ, механизм которого связан с активацией клеточного компонента иммунного ответа, в первую очередь антиген-специфичных резидентных CD8⁺ Т-лимфоцитов памяти. *Разработка вакцины на основе используемого подхода позволит избежать проблем, связанных с ошибками прогнозирования*

штаммового состава вакцины и гетерогенностью вирусной популяции в течение одного эпидемического сезона.

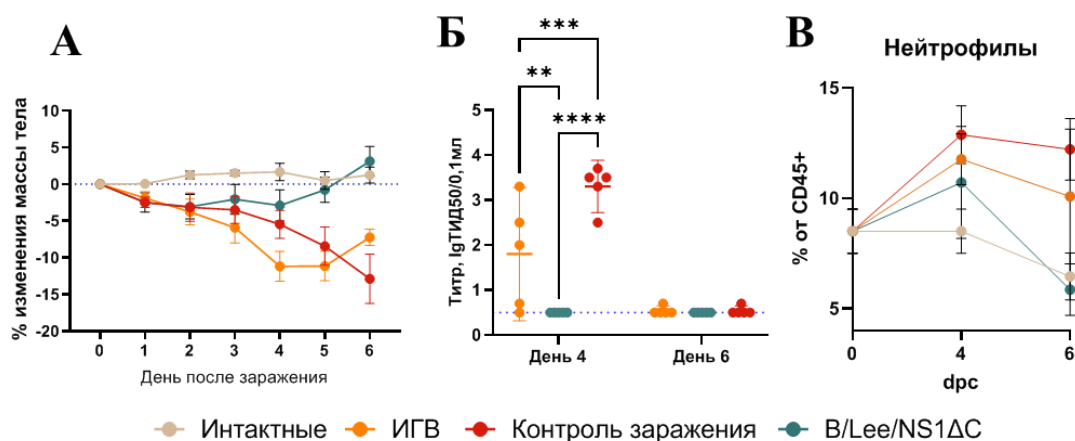


Рисунок – Сравнение защитной эффективности иммунизации штаммом B/Lee/NS1ΔC и прототипом ИГВ в отношении инфекции гетерологичным вирусом гриппа В.

(А) Динамика массы тела мышей; (Б) Вирусная нагрузка в БАЛ мышей; (В) Доля нейтрофилов в популяции CD45+ клеток в легких мышей

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРС МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

*Шыныбекова Г.О., Кожабергенов Н.С., Бопи А.К., Алмежанова М.Д., Жаксылык С.Б.,
Червякова О.В., Керимбаев А.А, Султанкулова К.Т.*

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Национальный холдинг «QazBioPharm», пгт. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС) официально внесен в список особо опасных заболеваний КРС в Республике Казахстан наряду с такими заболеваниями как нодулярный дерматит, ящур и сибирская язва. Эпизоотологическая ситуация наблюдается в большинстве хозяйств РК, возбудители респираторных заболеваний имеют источником в виде завозного скота, из других регионов или стран. Таким образом, ранняя диагностика и профилактика вирусных респираторных заболеваний на территории РК является актуальной задачей.

ИРТ КРС – острое инфекционное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и поражением половых органов. Возбудитель инфекции относится к семейству герпесвирусов *Herpesviridae*. Предрасположены все породы коров, молодые животные более восприимчивы к этому заболеванию, чем взрослые. Вирус выделяется из носа, слезами, молоком, мочой, фекалиями и спермой. Болезнь регистрируется во всем мире, причиняет значительный экономический ущерб мясному и молочному скотоводству.

Согласно данным Министерства сельского хозяйства РК, по состоянию на 05 февраля 2025 года, в разделе диагностических средств реестра представлены препараты, на основе ПЦР и ИФА, предназначенные для выявления различных инфекционных заболеваний животных, включая ИРТ КРС. Это говорит о том, что существует постоянная потребность в надежных и доступных диагностических тест-системах. На рынке Казахстана представлен широкий ассортимент коммерческих ПЦР тест-систем для диагностики ИРТ КРС. Данные тест-системы, несмотря на высокое качество, могут быть менее доступны из-за более высокой стоимости и зависимости от внешних поставок.

Учитывая, что на рынке Казахстана отсутствует ПЦР тест системы для диагностики ИРТ КРС отечественного производства. Целью исследования является разработка эффективной тест-системы для диагностики ИРТ КРС методом ПЦР РВ, которая поможет быстро идентифицировать данное заболевание. Это позволит своевременно реагировать на угрозы распространения вируса и применять необходимые меры борьбы и профилактики.

В наших исследованиях были подобраны и синтезированы специфические праймеры и зонд по гену гликопротеина D (gD) белка, поскольку в данном участке генома имеются специфические сайты для дифференциации вируса ИРТ от других видов альфагерпесвирусов. Провели оптимизацию реакционной ПЦР-смеси с добавлением сконструированных нами видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для амплификации ДНК вируса ИРТ КРС. Анализ результатов ПЦР в режиме реального времени проводят в программном обеспечении используемого термоциклера.

В результате проведения лабораторных исследований разработанная тест-система для диагностики ИРТ КРС на основе метода ПЦР РВ проверена по параметрам специфичности с применением ДНК и кДНК различных вирусов, как оспа коров, нодулярный дерматит КРС, вирусная диарея КРС, вирус парагриппа-3 КРС, инфекционный ринотрахеит КРС. При постановке ПЦР-РВ в качестве положительного контроля использована сконструированная плазмидная ДНК со вставкой фрагмента gD гена вируса ИРТ КРС. В качестве отрицательного контроля использована деионизированная вода. Также была определена чувствительность данной тест-системы, для этого были приготовлены серии из 10-ти кратных разведений плазмидной ДНК со вставкой фрагмента gD гена вируса ИРТ КРС с концентрациями от 1 нанограмм до 1 аттограмм в реакционной смеси. При расчете на калькуляторе нуклеиновых кислот можно определить, что 1 аттограмм плазмидной ДНК со вставкой содержит 1 копию молекулы ДНК вируса ИРТ. Результаты исследований показали, что разработанная тест-система на основе ПЦР РВ работает специфично, а порог чувствительности составляет 1-10 копий молекул ДНК, что является хорошим показателем для диагностики вируса ИРТ КРС.

Таким образом, данная тест-система считается надежным, чувствительным и специфичным для выявления вируса ИРТ в пробах от крупного рогатого скота.

Данная работа выполнена в рамках ПЦФ: «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» (ИРН BR2180004/0223).

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ И СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ КАК СРЕДСТВ ДОСТАВКИ МРНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА А (H5NX)

***Яковлев В.А., Литвинова В.Р., Рудометова Н.Б., М.Б. Боргоякова, Тигеева Е.В.,
Старостина Е.В., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Карпенко Л.И., Рудометов А.П.,
Ильичев А.А.***

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

Высокопатогенные вирусы птичьего гриппа, особенно подтипа H5, представляют опасность как для домашней птицы, так и для здоровья человека. Разработка эффективной и легкой в производстве вакцины является актуальной задачей в связи с опасениями по поводу пандемического потенциала вируса подтипа H5. В связи с постоянно мутирующими подтипами гриппа птиц, а также в связи с риском реассортации, увеличивается потребность в технологиях производства вакцин с быстро масштабируемым производством, способных обеспечить эффективную защиту от высоковариабельных патогенов в сжатые сроки.

Одним из подходов, удовлетворяющих таким требованиям, являются вакцины на основе мРНК. Ключевым моментом в разработке вакцин на основе мРНК является выбор метода представления антигена иммунокомпетентным клеткам организма (доставка). Методы доставки работают как молекулярные адъюванты, позволяя усилить иммуногенность вакцины на порядки. Двумя перспективными методами доставки являются липосомальные наночастицы (ЛНЧ) и струйная инъекция (СИ).

ЛНЧ являются эффективным методом доставки, так как они способны успешно доставить мРНК в цитозоль клетки-мишени, а также защитить ее от деградации в организме. СИ - метод доставки, который легко реализуем технологически и позволяет существенно повысить иммуногенность мРНК-вакцин, одновременно снижая их реактогенность. Важным преимуществом СИ является то, что она не требует использования химических и биологических веществ в составе препарата в качестве адъювантов, т.к. само физическое воздействие на клетки оказывает адъювантное действие. Как следствие, использование данного метода не приводит к накоплению в тканях побочных продуктов и не вызывает сильных побочных эффектов.

Ранее в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была получена кандидатная мРНК-вакцина, кодирующая модифицированный тример гемагглютинаина высокопатогенного вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), названная мРНК Cas1 CC-H5.

Данная работа была нацелена на анализ иммуногенности полученной мРНК-вакцины при введении ее в организм мышей в дозе 30 мкг с использованием двух методов доставки – ЛНЧ и СИ. мРНК Cas1 CC-H5 была инкапсулирована в ЛНЧ, которые были охарактеризованы и проанализированы методами динамического и электрофоретического светорассеяния, а также электронной микроскопии. Показано, что используемый состав ЛНЧ обеспечивает инкапсуляцию более 90% мРНК, формируя монодисперсную суспензию наночастиц со средним размером $93,5 \pm 0,8$ нм.

Была проведена иммунизация мышей BALB/c полученным препаратом мРНК-ЛНЧ, а также мРНК в PBS с использованием СИ. Показано, что иммунизация мышей BALB/c полученной мРНК-вакциной вызывает выработку высокого титра специфических антител, в том числе обладающих вируснейтрализующей активностью, а также активацию как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов. Стимуляция обеих субпопуляций свидетельствует о формировании сбалансированного вирус-специфического Т-клеточного ответа, очень важного для противовирусной защиты, особенно от гетерологичных штаммов. Установлено, что инкапсуляция в ЛНЧ позволила значительно усилить иммуногенность вакцины и достичь наибольшего в эксперименте титра специфических антител IgG, который составил 1:72000, при этом средний титр вируснейтрализации составил 1:5280. Струйная инъекция стимулирует иммунный ответ на более низком уровне: средний титр специфических антител составил 1:17000, при среднем титре вируснейтрализации 1:1600.

Таким образом, установлено, что при введении одинаковой дозы мРНК, инкапсуляция в ЛНЧ позволяет стимулировать более высокий уровень иммунного ответа. При этом, СИ является перспективным методом доставки, т.к. лишена недостатков, связанных с накоплением побочных продуктов распада ЛНЧ в организме, стимулируя хотя и меньший, но вполне приемлемый иммунный ответ. Исходя из этого, необходима оптимизация состава ЛНЧ для повышения их безопасности, а в случае с СИ изучение дозозависимых свойств мРНК вакцины.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ

Сборник тезисов
Всероссийской конференции молодых ученых,
посвященной 80-летию
со дня рождения академика РАН О. И. Киселева

Санкт-Петербург
10–11 апреля 2025 года

Подписано в печать 21.04.2025. Формат 60×84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 5,25. Тираж 26. Заказ 1821.

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.

