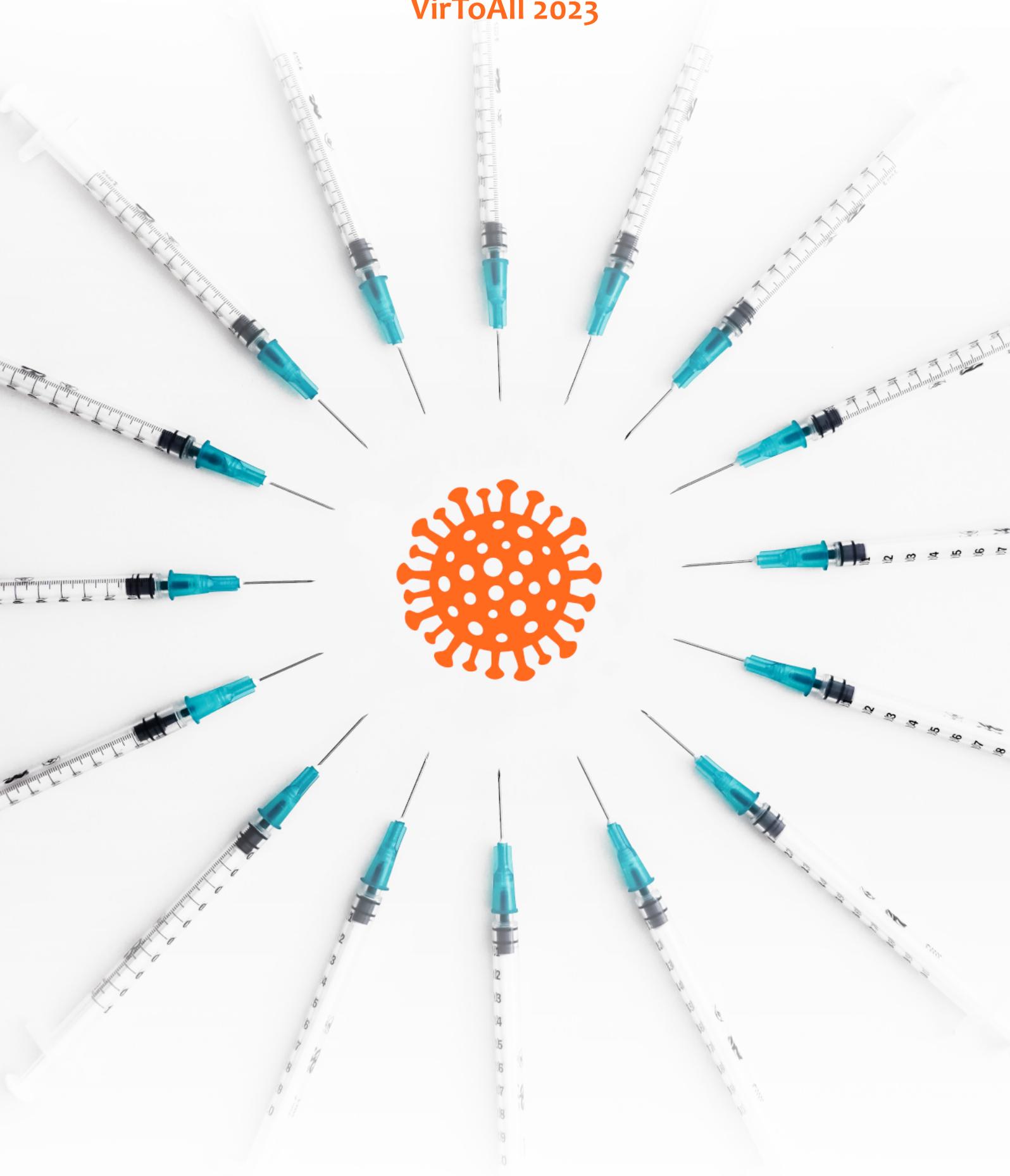


ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ — ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ VirToAll 2023



СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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



ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ

Сборник тезисов
Всероссийской конференции молодых ученых

Санкт-Петербург

13–14 апреля 2023 года



Санкт-Петербург
2023

УДК 578.7
ББК 28.3:52.63
В52

Вирусные инфекции – от диагностики к клинике : сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2023 г. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023. – 110 с.

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

Материалы публикуются в авторской редакции.

ISBN 978-5-7422-8074-3

© Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт
гриппа имени А. А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации, 2023
© Jeremy Bezanger, Unsplash,
фото обложки, 2023
© Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Авдонина Е.Д., Артемова Э.А., Банделюк А.С., Седова Е.С., Шмаров М.М.</i> КРОСС-ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА В	8
<i>Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н., Сивец Н.В., Савинова О.В., Шмелева Н.П.</i> ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ПО ГРИППУ ВО ВРЕМЯ ПАНДЕМИИ COVID-19 В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ	10
<i>Бикметова К.Р., Веселова О.А., Паркина Н.В., Кулешов К.В., Подколзин А.Т.</i> ЦИРКУЛЯЦИЯ РОТАВИРУСОВ ГЕНОТИПА G9P[4] НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	12
<i>Бродская А.В., Макашов А.А.</i> ПОИСК КОНСЕРВАТИВНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ГЕНОМЕ РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА	14
<i>Булычева Ю.И., Бутенко А.М., Маркина Т.А., Ларичев В.Ф., Козлова А.А., Баранец М.С., Дзагурова Т.К., Альховский С.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ЗООНОЗНОЙ ПАРАМИКСОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	16
<i>Быков Р.О., Семенов А.В., Итани Т.М., Чалана В.И., Старикова П.К.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2022 ГОД	18
<i>Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Зрелкин Д.И., Зубкова О.В.</i> ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕПЛИКАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ШИМПАНЗЕ 25-ГО СЕРОТИПА В ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕК293	21
<i>Вон П.Ф., Баженова Е.А., Рак А.Я., Исакова-Сивак И.Н.</i> ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОТИПА ГИБРИДНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПРОТИВ ДВУХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ВИРУСА ГРИППА В	23
<i>Высочинская В.В., Клотченко С.А., Шишлянников С.М., Добровольская О.А., Елиин Н.Д., Елпаева Е.А., Маслов М.А.</i> ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЛИПИДОВ В СОСТАВЕ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ 2X3-DOPЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ мРНК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	25
<i>Гайдаров А.О., Тургиев А.С., Карамов Э.В.</i> МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ	27
<i>Голдовская П.П., Бидина А.Д., Климкина И.А., Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В.</i> СТРУКТУРА СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТИ К ТРЕМ СЕРОТИПАМ АДЕНОВИРУСА ИЗ ПОДГРУППЫ D	28
<i>Головина Л.А., Хусейн З., Эльдиб А.А., Колпащиков Д.М., Комиссаров А.Б.</i> ДНК-МАШИНЫ НА ОСНОВЕ БИНАРНЫХ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ БЕЗАМПЛИФИКАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ SARS-CoV-2	30

<i>Горячева А.Н., Ожаровская Т.А., Попова О., Зрелкин Д.И., Зубкова О.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ОРИЕНТАЦИИ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА	32
<i>Гошина А.Д., Матюшенко В.А., Долина С.А., Меженская Д.И., Рак А.Я., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.</i> ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ИНАКТИВАЦИИ СЫВОРОТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ НА ВЫЯВЛЕНИЕ УРОВНЕЙ IgG-АНТИТЕЛ К SARS-CoV-2 И ВИРУСУ ГРИППА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ	34
<i>Есьман А.С., Голубева А.Г., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.</i> РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ В МОНИТОРИНГЕ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2	36
<i>Карчевская А.А., Ибрагимова М.К., Хозяинова А.А., Цыганов М.М.</i> ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭПИТЕЛИИ БРОНХОВ	38
<i>Коклюшкина А.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Амосова И.В., Грудинин М.П.</i> ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА ФИБРИЛЛЫ АДЕНОВИРУСА 5 ТИПА	40
<i>Кольцова И.В., Кистенева Л.Б., Домонова Э.А., Сильвейстрова О.Ю.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА ПО ЗАРАЖЕНИЮ ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ СРЕДИ БЕРЕМЕННЫХ В г. МОСКВЕ	42
<i>Комиссарова К.С., Елиин Н.Д.</i> СОЗДАНИЕ ПАНЕЛЕЙ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА	44
<i>Кондратьева В.М., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Мусиенко М.И., Латышев О.Е., Шемельков Е.В., Гребенникова Т.В.</i> ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ХОРЬКОВ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19	46
<i>Корюков М.А., Кечин А.А., Гордукова М.А., Кузнецов В.Е., Храпов Е.А., Субботин С.В., Филипенко М.Л.</i> ТАРГЕТНАЯ NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА	48
<i>Котомина Т.С., Матюшенко В.А., Меженская Д.А., Кудрявцев И.В., Прокопенко П.И., Матушкина А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.</i> ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ГРИППА КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА	50
<i>Ксенафонтов А.Д., Писарева М.М., Едер В., Мусаева Т.Д., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б., Киселева И.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РИНОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2020-2021 гг.	52

<i>Кудря К.С., Сергеева М.В., Журавлев Е.С., Матвеева А.М., Степанов Г.А.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЧАСТИЧНОГО НОКАУТА ГЕНА <i>SNORD93</i> В КЛЕТКАХ A549 НА ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ	54
<i>Ложков А.А., Шишлянников С.М., Плотникова М.А., Добровольская О.А., Клотченко С.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ IFN- λ <i>in vivo</i> НА МОДЕЛИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, ОСЛОЖНЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ	56
<i>Максимова А.Ю., Плотникова М.А., Клотченко С.А.</i> РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА	58
<i>Мансур У., Фадеев А.В., Комиссарова К.С., Комиссаров А.Б., Потехин А.А., Лиознов Д.А.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПАРАГРИППА ТРЕТЬЕГО ТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА	61
<i>Матушкина А.С., Матюшенко В.А., Степанова Е.А., Котомина Т.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.</i> ОЦЕНКА РЕПЛИКАТИВНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОГЕННЫЕ ФРАГМЕНТЫ РЯДА РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ В ГЕНАХ NA, NA И NS	63
<i>Матюшенко В.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА A/N1N1 К КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK	65
<i>Меркурьев А.В., Меженская Д.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> ВСТРАИВАНИЕ ЭПИТОПА M2E В АНТИГЕННЫЙ САЙТ МОЛЕКУЛЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТОТИПА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ	67
<i>Мишкин А.А., Афолина Н.М., Лысенков В.Г., Надтока М.И., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.</i> ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ В РОССИИ	69
<i>Монахов Н.Э., Сизова Н.В., Ермаков А.И., Лиознов Д.А.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА	70
<i>Морозова Н.Е., Потысьева А.С., Ведяйкин А.Д., Арсениев А.Н., Мельников А.С., Сердобинцев П.Ю., Курдюмова И.В., Криворучко А.Б., Якунина М.В., Ходорковский М.А.</i> РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И ТЕХНОЛОГИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ	72
<i>Мусаева Т.Д., Фадеев А.В., Писарева М.М., Едер В., Ксенафонтов А.Д., Киселева И.В., Комиссаров А.Б.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2017-2021 гг. ПО ДАННЫМ ФРАГМЕНТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ S ГЕНА	74

<i>Ожерельева О.О., Шуклина М.А., Видяева И.Г., Степанова Л.А.</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОГО Т-ХЕЛПЕРНОГО ПЕПТИДА PADRE ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ	76
<i>Орлова Е.Д., Даниленко Д.М., Тянь Н.С., Бабаченко И.В.</i> ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЙ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ ПРИ ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ И РИНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПОРАЖЕНИЕМ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	78
<i>Передерий А.А., Айвазьян И.С., Полякова В., Лунарев А., Фадеев А.В., Ксенафонтов А.Д., Коржанова М., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Лиознов Д.А.</i> РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЭНТЕРОВИРУСА D68	80
<i>Петрова Е.Р., Кривицкая В.З., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Сверлова М.В., Комиссарова К.С., Соминина А.А., Даниленко Д.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К F-БЕЛКУ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА	81
<i>Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Шелепанова Т.Н., Васильева А.Д., Коновалова Н.И.</i> ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	83
<i>Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Шелепанова Т.Н., Васильева А.Д., Желтухина А.И., Коновалова Н.И.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2022-2023 гг.	85
<i>Прокопенко П.И., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Гошина А.Д., Чистякова А.К.</i> УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОВ NS И NP	86
<i>Пулькина А.А., Шуклина М.А., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., Шурыгина А.-П.С., Стукова М.А., Егоров А.Ю.</i> ВКЛЮЧЕНИЕ СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА IgG _k УВЕЛИЧИВАЕТ ИММУНОГЕННОСТЬ ВСТАВКИ АНТИГЕНА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В СОСТАВЕ ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА	88
<i>Разгуляева Д.Н., Штро А.А., Яровая О.И., Соколова А.С.</i> РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БОРНИОЛА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА	90
<i>Рак А.Я., Забродская Я.А., Горбунов Н.П., Поляков Д.С., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.</i> ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НУКЛЕОКАПСИДА SARS-CoV-2 И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ	91
<i>Смирнов С.В., Амосова И.В., Шалджян А.А., Шишлянников С.М., Елтаева Е.А., Тимошичева Т.А., Грудинин М.П.</i> ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА АДЕНОВИРУСА 5 СЕРОТИПА	93

<i>Соляникова В.В., Горбенко Д.А., Рубель М.С., Колпацников Д.М., Штро А.А.</i> РАЗРАБОТКА МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫХ ДНК-НАНОМАШИН С КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВИРУСОВ	95
<i>Тян Н.С., Бабаченко И.В., Голева О.В., Орлова Е.Д., Безверхая Н.С., Кузьмина А.А., Филаева Н.А., Крылов А.В., Эйсмонт Ю.А., Мукомолова А.Л., Базиян Е.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНАЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА- БАРР И ВИРУСОМ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6, У ДЕТЕЙ	97
<i>Флорен А.М., Ажойчик Е.В., Царева Т.Р., Сорокин Е.В.</i> МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГРИППА В/НОРВЕГИЯ/2134/2019 ЯМАГАТСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ	99
<i>Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Маркович В.А.</i> ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА	101
<i>Чудинов И.К., Самойлов А.Е., Сперанская А.С.</i> МЕТРИКА РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ НУКЛЕОТИДНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ SARS-CoV-2 НА ОСНОВАНИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ МУТАЦИЙ	103
<i>Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ожерельева О.О., Цыбалова Л.М.</i> ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FLG-НА-2-4М2Е ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЭПИТОПА БЕЛКА NP	106
<i>Юрченко А.В., Добровольская О.А., Елпаева Е.А.</i> ПРОВЕРКА ЭФФЕКТИВНОСТИ <i>in vitro</i> ТРАНСКРИПЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ T7 РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ	108

КРОСС-ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА В

Авдонина Е.Д., Артемова Э.А., Банделюк А.С., Седова Е.С., Шмаров М.М.

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

В популяции людей вирусы гриппа типа А циркулируют совместно с вирусами гриппа В. И хотя последние не вызывают пандемий, они являются причиной локальных вспышек и эпидемий, которые могут охватывать несколько стран. Недавние исследования показали, что инфицирование вирусом гриппа В не менее опасно, чем вирусом гриппа А. Более того, вирус гриппа В чаще является причиной тяжелого течения болезни у маленьких детей и у людей старше 60 лет.

На данный момент вирусы гриппа В представлены двумя линиями: В/Yamagata/16/88-подобные (Yamagata) или В/Victoria/2/87-подобные (Victoria). Современные вакцины включают штаммы гриппа В одной или двух линий. Из-за изменений в антигенной структуре гемагглютининов вируса гриппа, периодически требуется обновление состава гриппозных вакцин.

Нами был создан вирусный вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, экспрессирующий ген гемагглютиниона вируса гриппа В штамма В/Colorado/06/2017 линии Victoria, который преимущественно циркулировал с 2017 по 2020 год (Ad5-В/Colorado). Данный рекомбинантный аденовирус входит в состав разрабатываемой векторной четырехвалентной вакцины для профилактики гриппа.

В проведенном исследовании мышам линии BALB/c, весом 14-16 грамм, интраназально вводили $3 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц Ad5-В/Colorado в объеме 50 мкл на животное. Через 28 суток у части мышей отбирали кровь и получали сыворотку. Образцы тестировали методами РТГА и непрямого ИФА на наличие специфических антител к антигену – вирусу гриппа В/Washington/02/2019 (линия Victoria), циркулирующего с 2019 по 2022 год.

Затем, иммунизированных мышей заражали интраназально в дозе 15 LD₅₀ вирусом В/Washington/02/2019 (линия Victoria). В течение 14 дней оценивали выживаемость и потерю веса у подопытных животных.

По результатам серологических тестов, среднегеометрический титр (СГТ) специфических IgG к вирусу В/Washington составил в ИФА – 1008; СГТ специфических антител в РТГА – 63,5. Оба анализа показали достоверное отличие от контрольных групп ($p=0,022$).

Выживаемость (Рисунок 1А) опытной группы мышей к 14 суткам после заражения составила 100%. Падение веса и клинических признаков болезни не наблюдалось (Рисунок 1Б). Контрольные мыши теряли вес и погибли к 8 дню после заражения.

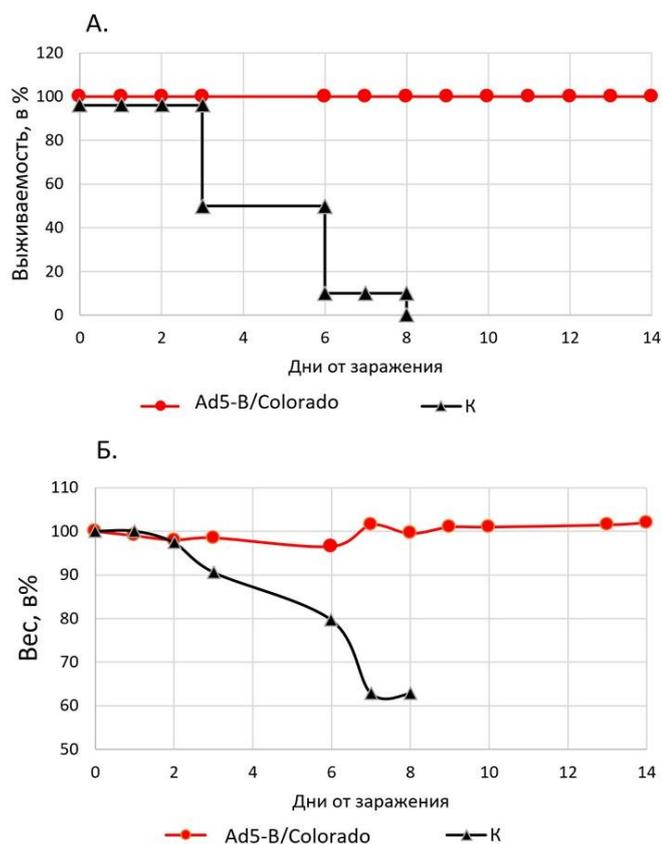


Рисунок 1. Графики выживаемости (А) и изменения веса (Б) мышей, зараженных интраназально в дозе 15 LD50 вирусом В/Washington/02/2019 (линия Victoria) в течение 14 дней. Красной линией показана иммунизированная Ad5-B/Colorado группа, черной – контрольная группа

В результате исследования было показано, что иммунизация животных вирусным вектором на основе рекомбинантного аденовируса пятого серотипа, экспрессирующего ген гемагглютинина вируса В/Colorado/06/2017 (линия Victoria), индуцирует выработку специфических антител, перекрёстно реагирующих с вирусом В/Washington/02/2019 той же линии, но циркулирующего в эпидсезонах с 2019 по 2022 год. При этом эффективность кросс-протективного действия составила 100%.

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ПО ГРИППУ ВО ВРЕМЯ ПАНДЕМИИ COVID-19 В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н., Сивец Н.В., Савинова О.В., Шмелева Н.П.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Введение: Грипп привлекает внимание специалистов своей непредсказуемостью и особенностями развития эпидемического процесса в условиях таких глобальных событий, как, например, пандемия COVID-19. Ввиду изменчивости возбудителя и его способности вызывать тяжелые респираторные заболевания, а также опасности появления новых вариантов, надзор за вирусами гриппа и другими возбудителями ОРВИ по рекомендациям ВОЗ осуществляется круглогодично.

Цель: определение особенностей эпидемического по гриппу процесса в условиях распространения инфекции COVID-19. Анализ сезонов гриппа проведен с 40 календарной недели (к.н.) 2020 г. по 10 к.н. 2023 г.

Материалы: Для представления более полной картины развития эпидпроцесса гриппа в Беларуси были проанализированы результаты дозорного и рутинного надзора за респираторными патогенами в контрольных городах. Исследовали назофарингеальные мазки от пациентов всех возрастных групп с клиническими проявлениями респираторных инфекций. По клинической симптоматике случаи классифицировались на острые респираторные инфекции (ОРИ), гриппоподобные заболевания (ГПЗ) и тяжелые острые респираторные инфекции (ТОРИ).

Выявление респираторных патогенов: ПЦР в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение: Проведенное исследование позволило оценить понедельную частоту встречаемости вирусов гриппа. Появление и повсеместное распространение вируса SARS-CoV-2, а также противоэпидемические мероприятия, направленные на предотвращение распространения инфекции COVID-19 серьезно повлияли на встречаемость респираторных патогенов вирусной этиологии, вытеснив в 2020-2021 гг. из ежегодной циркуляции вирусы гриппа. Полученные нами результаты соответствуют данным ВОЗ, когда в 2020-2021 гг. в Европейском регионе активность вирусов гриппа оставалась ниже межсезонного уровня, чем ожидалось для этого времени года.

Однако в сезоне 2021-2022 гг. вирусы гриппа вернулись в сезонную циркуляцию. Один из подъемов заболеваемости ОРИ был вызван вирусами гриппа, когда увеличение активности патогена началось на 47 неделе 2021 года с максимальной частотой встречаемости возбудителя 44,9% на 50 к.н. 2021 г. Активная циркуляция вирусов гриппа продолжалась 6 недель. В большинстве положительных находок в 2021-2022 гг. определялись вирусы гриппа А(Н3N2) – 83,9%.

В сезоне 2022-2023 гг. рост частоты встречаемости вирусов гриппа отмечен на 48 к.н. Активность возбудителя достигла пика на 50 к.н. 2022 г. – 51,7%. В начале сезона доминировали вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 с последующим нарастанием роли вирусов гриппа В.

Как в 2021-2022 гг., так и в 2022-2023 гг. по результатам дозорного надзора, среди заболевших гриппом лиц преобладали случаи, по клинической симптоматике относящиеся к категории ОРИ – 53,9% и 75,0% соответственно.

Развитие эпидпроцесса было связано с вовлечением всех возрастных групп, однако наибольший вклад в распространение гриппа в 2021-2022 гг. внесли дети до 14 лет (58,8%), в то время как в сезоне 2022-2023 гг. ведущее место в возрастной структуре заболевших занимали дети до 14 лет и взрослые 30-64 лет (по 40,9%). Наименьшая доля в структуре заболевших как в 2021-2022 гг., так и в 2022-2023 гг. приходилась на пациентов старше 65 лет – 2,0% и 2,3% соответственно, однако в данной возрастной группе грипп протекал преимущественно в форме ТОРИ (71,4% и 100%).

Выводы: Вирусы гриппа традиционно внесли значительный вклад в заболеваемость ОРИ в 2021-2022 и 2022-2023 гг. Популяция циркулирующих вирусов гриппа была гетерогенной. Грипп преимущественно протекал в легкой форме с вовлечением в эпидпроцесс всех возрастных групп. Однако пациенты старше 65 лет составили группу повышенного риска тяжелого течения заболевания.

ЦИРКУЛЯЦИЯ РОТАВИРУСОВ ГЕНОТИПА G9P[4] НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Бикметова К.Р., Веселова О.А., Паркина Н.В., Кулешов К.В., Подколзин А.Т.

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

В настоящее время в мире наиболее распространены пять генотипов ротавируса (Rotavirus grA, RVA), обозначаемых по комбинациям сегментов генома VP4 (P) и VP7 (G) – G1P[8], G3P[8], G4P[8], G2P[4], G9P[8]. Наряду с ними присутствует постоянная циркуляция минорных генотипов RVA, периодически их локальная распространенность в отдельных регионах может конкурировать с представленностью доминирующих генотипов. Одним из редко регистрируемых генотипов является генотип G9P[4].

Первый эпизод выявления единичного изолята G9P[4] был описан в Бразилии в 1999 г. Впоследствии наблюдалось достаточно быстрое распространение данного варианта RVA в странах Латинской Америки. В свою очередь в США, несмотря на территориальную близость к Латинской Америке, регистрировались единичные случаи изоляции генотипа G9P[4]. В странах Евросоюза в 2017-2020 гг. распространенность данного генотипа составляла до 5-7%.

Целью работы явилась характеристика распространения RVA G9P[4] на территории Российской Федерации.

Работа проводилась в рамках деятельности референс-центра по мониторингу возбудителей острых кишечных инфекций Роспотребнадзора функционирующего на базе лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора в период 2012-2022 гг. В исследование включали детей со спорадической заболеваемостью инфекционными диареями в возрасте младше 5 лет, а также 3 очага групповой заболеваемости, патогеном в которых являлся RVA с генотипом G9P[4].

В период 2012-2022 гг. было проведено генотипирование образцов от 3061 детей, содержащих РНК RVA. На долю пяти преобладающих в мире генотипов (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G2P[4], G9P[8]) ежегодно приходилось от 99 до 84% изолятов. В период 2012-2016 гг. отмечалось преобладание генотипа G4P[8]. В период 2017-2019 гг. произошла смена доминирующего генотипа на G9P[8] с его преобладанием до 2021 г. В 2022 г. произошло резкое увеличение доли генотипа G3P[8], составившего примерно 70% всех изолятов.

Наблюдая за динамикой редко встречающегося генотипа G9P[4] на протяжении последних лет, видно, что его рост отмечается в последние годы. До 2017 г. случаи выявления RVA G9P[4] на территории России не документировались. Так в период 2012-2022 гг. из 3061 образцов, положительных по содержанию РНК RVA, было выявлено 36 (1,18%) образцов, содержавших RVA G9 и P[4] генотипов (2012-2016, 2019 гг. – 0; 2017 – 3; 2018 – 3; 2020 – 3; 2021 – 2; 2022 – 25 образцов). Из них 24 от лиц со спорадической заболеваемостью и 12 от лиц связанных с тремя эпидемическими кластерами. Из 25

образцов, выявленных в 2022 г., 9 (36%) были получены от лиц, прибывших с территории Украины. Отметим, что в выборке из 48 образцов, содержащих РНК RVA от лиц, прибывших с других территорий, генотип G9P[4] занимал второе ранговое место по распространенности, а частота его выявления была достоверно выше ($p=0,046$, χ^2 test), чем у обследованных лиц в Российской Федерации.

Выявленное в данном исследовании резкое возрастание удельной доли изолятов ротавирусов группы А генотипа G9P[4] в 2022 г. с наибольшей вероятностью является следствием комбинированного влияния двух факторов. С одной стороны, в период 2020-2022 гг. реализация противоэпидемических мероприятий, связанных с пандемией COVID-19 привела к резкому снижению активности циркуляции ротавирусов с формированием эпидемиологического эффекта «бутылочного горлышка», дестабилизировавшего генотиповой состав популяции возбудителя. С другой стороны, в 2022 г. резко активизировались миграционные процессы, с преимущественным въездом в страну жителей с территории Украины, в том числе через территории Европейских стран, характеризовавшихся высокой распространенностью данного генотипа. По данным управления Верховного комиссара ООН по делам беженцев, по состоянию на 6 декабря 2022 г. Российская Федерация занимала первое место по числу беженцев (2 870 182 человека) прибывших с территории Украины (без учета въезда через территорию третьих стран).

ПОИСК КОНСЕРВАТИВНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ГЕНОМЕ РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА

Бродская А.В.^{1,2}, Макашов А.А.^{1,3}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

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

³ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Инфекционные заболевания, вызываемые вирусами рода *Rotavirus*, представляют собой огромную опасность для населения, в особенности для группы детей младшего возраста и групп иммунокомпрометированных пациентов. В настоящее время на рынке полностью отсутствуют этиотропные препараты против ротавируса, и практикуется исключительно неспецифическая поддерживающая терапия, нередко оказывающаяся неэффективной. В качестве концептуальной идеи по созданию нового этиотропного препарата для терапии ротавирусных инфекций нами был выбран механизм РНК-интерференции, позволяющий осуществлять высокоспецифичное и направленное и эффективное ингибирование экспрессии вирусных генов. Дополнительно использование малых интерферирующих РНК (далее миРНК) позволяет осуществлять как одновременное ингибирование различных штаммов вируса за счет подбора миРНК к консервативным участкам, так и подбор узко направленного препарата к определенному штамму.

В данной работе мы сосредоточились на поиске потенциальных мишеней для РНК-интерференции в двух сегментах, кодирующих неструктурные белки ротавируса, которые выполняют критические функции для сборки новых вирионов, и не так сильно подвержены мутационному давлению, как гены поверхностных белков вириона. Были исследованы белок кодирующие области мРНК и аминокислотные последовательности сегментов. Было проведено выравнивание последовательностей пятого сегмента, кодирующего белок NSP1, и 10 сегмента, кодирующего белок NSP4, ротавируса человека типа А с целью поиска консервативных областей. Проанализированы 2285 аминокислотных и 538 нуклеотидных последовательностей для 5го сегмента, также 1167 и 860 последовательностей для 10го сегмента соответственно, представленных в базе GenBank (NCBI virus) на февраль 2023 года. Провели множественное выравнивание последовательностей с применением алгоритма MAFFT. В результате был проведен эволюционный анализ изменчивости для белков NSP1 и NSP4 ротавируса человека типа А и выявлены участки, с повышенной консервативностью.

Далее в анализируемых нуклеотидных последовательностях *in silico* выявляли специфические консервативные последовательности длиной 25 нуклеотидов, удовлетворяющих условиям, предъявляемым к малым интерферирующим РНК согласно Elbashir et al. 2001 и Reynolds et al. 2004. Был проведен биоинформатический анализ для выявления консервативных, уникальных и повторяющихся последовательностей - возможных мишеней РНК интерференции ротавирусных генов различных штаммов.

В результате для 5го сегмента было отобрано 2 потенциальные области, которые могут являться мишенными для ингибирования противовирусных миРНК: 260-300 и 675-750 (позиции в нуклеотидной последовательности консенсуса, полученной при выравнивании); и 3 потенциальные консервативные области для 10го сегмента: 160-210, 360-395, 460-490.

Далее был проведен поиск и дизайн потенциальных противовирусных миРНК направленных на консервативные области генов NSP1 и NSP4. В данный момент проводится скрининг вирус ингибирующего действия выбранных миРНК на клеточной модели инфекции для разных штаммов ротавируса.

Работа поддержана грантом РФФ 22-74-10117.

ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ЗООНОЗНОЙ ПАРАМИКСОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Булычева Ю.И.¹, Бутенко А.М.¹, Маркина Т.А.², Ларичев В.Ф.¹, Козлова А.А.¹,
Баранец М.С.¹, Дзагурова Т.К.³, Альховский С.В.¹

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

²ФГБУ Окский государственный природный биосферный заповедник, Рязанская область,
Россия

³ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук, Москва, Россия

Грызуны (*Rodentia*) являются важнейшим природным резервуаром множества вирусных инфекций человека и животных. Рыжая полёвка (*Myodes glareolus*) – основной резервуар для вируса Пуумала – возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Известно, что у рыжих полёвок также обнаружены вирусы, принадлежащие к 13 различным семействам (*Arenaviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Poxviridae* и т. д.).

В 1973 году на территории Башкирии при обследовании очагов ГЛПС из почек рыжих полёвок было выделено несколько штаммов нового вируса, получившего название вирус рыжих полёвок (ВРП). Полногеномное секвенирование этого вируса указало на его принадлежность к роду *Narmovirus* семейства *Paramyxoviridae*. Целью настоящей работы было определить распространенность новых парамиксовирусов грызунов в активных очагах ГЛПС в разных регионах России, а также выявить их роль в инфекционной патологии человека. Была разработана гнездовая ПЦР тест-система для выявления генома новых парамиксовирусов в полевых образцах, и ИФА наборы для определения IgG и IgM к вирусу РП в сыворотках крови людей.

В ПЦР нами проанализированы 753 полевых проб органов рыжих полёвок (суспензия лёгких и почек) из разных регионов России, собранные в период с 2018 по 2022 год. Из них выявлено 10 положительных, включая 2 (из 127 всего обследованных проб) в Воронежской области, 1 (из 200) в Ульяновской области, и 7 (из 186) в Рязанской области. Таким образом, заражённость рыжих полёвок на обследованных территориях составила от 0.5% (Ульяновская обл.) до 5.3% (Рязанская обл.). Положительные пробы были секвенированы. В результате нами показано, что циркулирующая популяция ВРП гетерогенна, и различия между штаммами могут достигать 10% по анализируемому гену нуклеокапсида (N). На дендрограмме штаммы ВРП формируют две ветви, одна из которых включает пробы из Ульяновской и Рязанской областей, а вторая штаммы из Воронежской области и Башкирии.

С помощью разработанных ИФА-IgG и ИФА-IgM тест-систем были обследованы 2287 сывороток крови доноров из Тульской, Липецкой, Ульяновской, Астраханской, Воронежской, Тамбовской областей (2018-2022 г.); 546 сывороток от больных, госпитализированных без подозрения и без обследования на ГЛПС из Саратовской области (2018 г.); 738 сывороток крови от больных с отрицательным результатом обследования на

ГЛПС из Тульской области (2018-2022 г.). IgG антитела к вирусу РП были обнаружены в сыворотках из Саратовской, Ульяновской, Тульской, Астраханской и Липецкой областей с частотой от 0.3 до 1.8% случаев. IgM-антитела обнаружены сыворотках из Саратовской и Тульской областей с частотой 0.9% и 1.6%, соответственно.

В результате проведённых исследований установлена активная циркуляция вируса рыжих полёвок на территории Европейской части России и генетическая вариабельность циркулирующих в очагах ГЛПС штаммов. Обнаружение специфических IgG-антител у населения обследованных территорий свидетельствует об экспозиции ВРП человеку. Вместе с тем, обнаружение специфических IgM антител свидетельствует о возможном значении данного вируса в патологии человека в качестве этиологического агента новой нозологической формы заболевания.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОРОВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ
ЗА 2022 ГОД**

Быков Р.О., Семенов А.В., Итани Т.М., Чалана В.И., Старикова П.К.

*Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром»
Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия*

Норовирусы являются высококонтагиозными возбудителями острого небактериального гастроэнтерита человека, реализующие свое заразное начало через фекально-оральный механизм передачи. Известно, что преобладающей группой в генотипической структуре норовирусов по всему миру является GII. Ранее на территории Свердловской области не проводился молекулярно-генетический мониторинг вместе с филогенетическим анализом, поэтому не предоставляется возможным объективно оценить генетическое разнообразие популяции норовирусов. Настоящее исследование посвящено изучению генетического разнообразия возбудителей норовирусной инфекции человека (НВИ) на территории Свердловской области и созданию филогенетических деревьев для определения попарных генетических расстояний между таксонами в двух геногруппах (GI; GII).

Цель работы – выполнить генотипирование и провести филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека на территории Свердловской области за 2022 год.

Материалы и методы. Материал: фекалии больных детей НВИ. Для амплификации выбран специфический участок генома, соответствующий региону ORF1/ORF2. Для постановки ПЦР был использован протокол Kojima вместе с вырожденными праймерами. Амплифицированные образцы были генотипированы методом секвенирования по Сэнгеру. Был проведен филогенетический анализ консенсусных последовательностей с построением аддитивных филограмм в программе MEGA, версия 11.

Результаты. Общее количество исследованных образцов составило n=220. По результатам секвенирования было обнаружено 73 последовательности возбудителей НВИ, что составляет 33% от общего объема исследованных образцов. Наибольший удельный вес в генотипической структуре занимает норовирусы GII – 58 %, норовирусы GI – 42 %. Генотипическое распределение полученных последовательностей имеет следующий вид: GII.17 (40%, n=28); GI.3 (33%, n=23); GII.4 (10%, n=7); GI.6 (7%, n=5); GII.3 (6%, n=4); GI.7 (4%, n=3). При построении филогенетического дерева консенсусные последовательности GI.3 из города Каменск-Уральский входят в общий кластер А. Последовательности из кластера А образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Бразилии, Японии, США, входящих в кластер В. Последовательности GI.5 из города Екатеринбург входят в общий кластер В. Изоляты из кластера В генетически неоднородны. Последовательность GI.5_197 имеет меньшую гомологию и наибольшую генетическую

дистанцию между другими генотипами, входящих в кластер В. Последовательности из кластера В образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Тайланда Южной Африки. Последовательности GI.6 из города Екатеринбург входят в общий кластер С. Последовательности из кластера С образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Японии. Последовательности GI.17 из города Нижний Тагил входят в общий кластер D. Последовательности из кластера D образуют парафилетическую группу с близкородственными генотипами из Китая (Рисунок 1).

Заключение. Впервые на территории Свердловской области был проведен генетический анализ структуры норовирусов. Норовирусы GI.17, GI.3 являются доминирующими генотипами, выявленными в 2022 году на территории Свердловской области. Консенсусные последовательности выявленных норовирусов демонстрируют наименьшую генетическую дистанцию с изолятами из Китая, Японии, США, Тайланда, и др., что говорит об убиквитарности идентифицированных генотипов. Отсутствие данных о структуре генотипического профиля возбудителей НВИ на территории Свердловской области в прошлом дает возможность предполагать, что выявленные норовирусы могли циркулировать ранее. Дальнейшая интеграция представленной структуры генотипирования в систему эпидемиологического надзора позволит с большей доступностью определять генетическое разнообразие возбудителей НВИ в Свердловской области.

Исследование выполнено в рамках НИР: «Мониторинг циркуляции и генетического разнообразия возбудителей норовирусной инфекции».

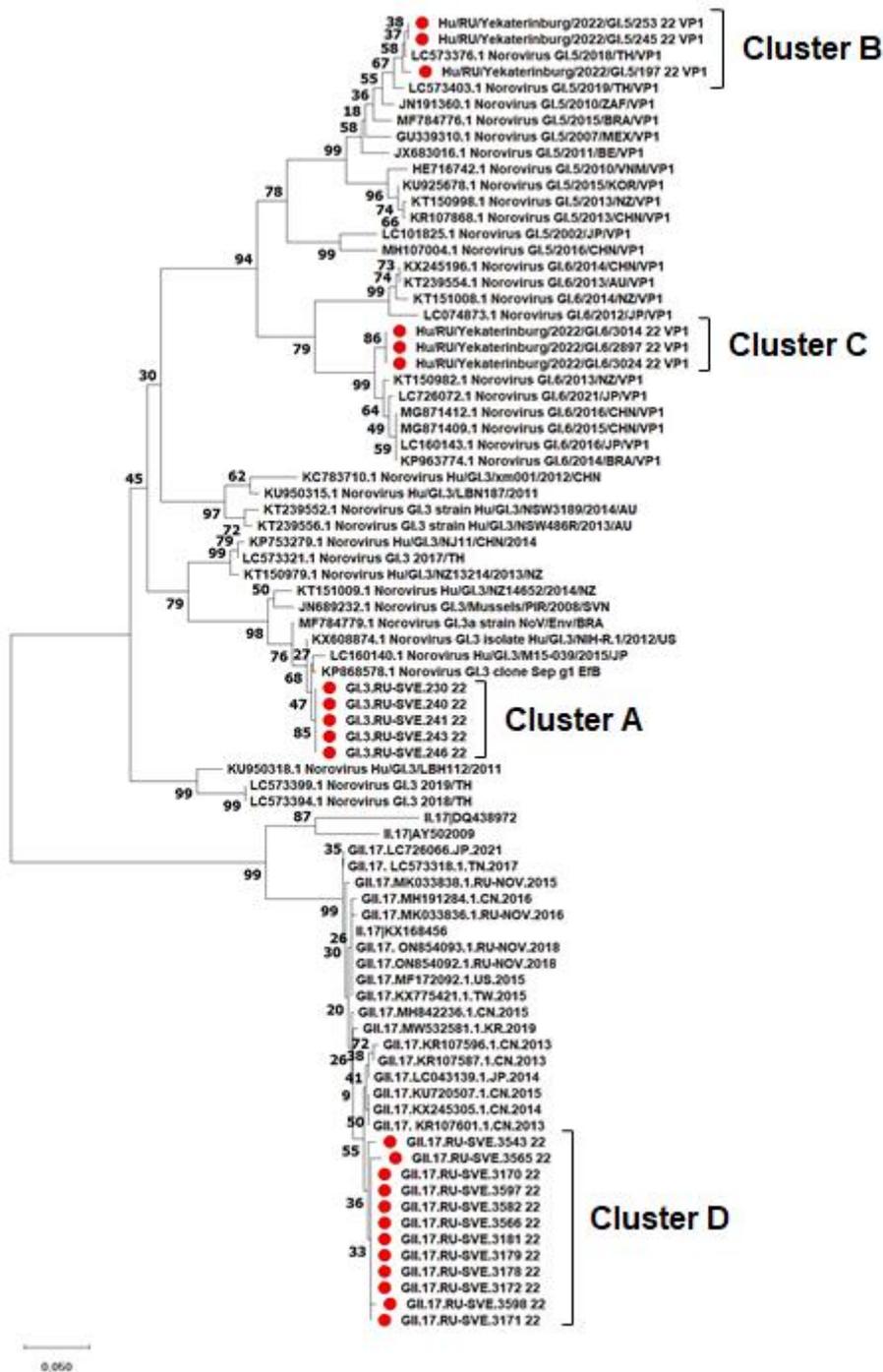


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей норовирусов генотипов GII.17, GI.3, GI.5, GI.6

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕПЛИКАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ШИМПАНЗЕ 25-ГО СЕРОТИПА В ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕК293

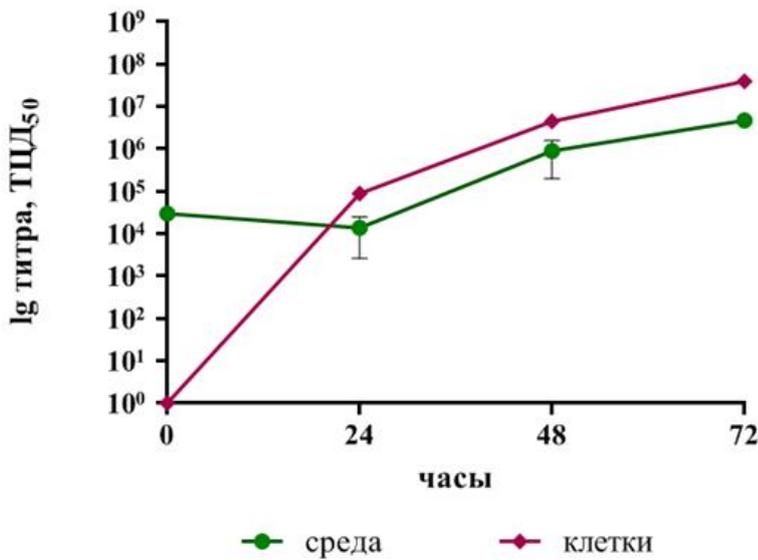
Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Зрелкин Д.И., Зубкова О.В.

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

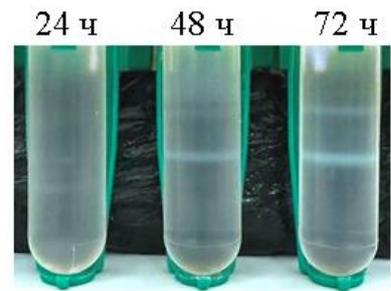
Рекомбинантные аденовирусные векторы широко применяются для разработки вакцин против многих инфекционных заболеваний, а также онкологических. Чаще используют вектор, основанный на повсеместно распространенном аденовирусе человека 5 серотипа (Ad5). Кроме того, аденовирус человека 26 серотипа (Ad26) часто применяют при разработке вакцин (например, вакцина Спутник V основана на Ad26 и Ad5). Важным ограничением клинического применения таких векторов является то, что у многих людей есть вируснейтрализующие антитела к вектору, наличие которых значительно ослабляет гуморальный и клеточный иммунный ответ на вакцинный антиген. Проблема предсуществующего иммунитета была решена путем разработки новых векторов на основе аденовирусов, выделенных из обезьян. Аденовирусы шимпанзе редко циркулируют среди людей, соответственно имеют низкую серопревалентность в человеческой популяции. Данные аденовирусы обладают схожими характеристиками с векторами на основе аденовирусов человека, например, устойчивой экспрессией целевого гена и безопасностью. Недавние исследования демонстрируют возможность разработки вакцинных препаратов на основе аденовирусов обезьян, например, создана вакцина на основе аденовируса обезьян 25 серотипа (ChAdOx1) для профилактики ковид-19. Поскольку одной из клеточных линий, используемых для производственного наращивания рекомбинантных аденовирусов, является НЕК293 (клетки почки эмбриона человека), важно знать особенности репликации нового аденовирусного вектора в данной культуре. Поэтому целью работы был анализ эффективности репликации рекомбинантного аденовируса шимпанзе 25-го серотипа (SAd25) в производственной культуре клеток НЕК293. Для этого использовали рекомбинантный аденовирус SAd25-EGFP, в котором E1-область генома заменена на экспрессионную кассету с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

Для оценки репликации аденовируса был получен препарат, титр которого определяли модифицированным методом титрования по конечным точкам ТЦД₅₀. Далее полученным препаратом инфицировали культуральные чашки диаметром 3 см (на которые высевались клетки НЕК293 в количестве 1×10^6 клеток на чашку) из расчета 0,03 ТЦД₅₀ на клетку. Через 24, 48 и 72 ч собирали клетки и среду с каждой из 2 чашек. Пробы подвергали трехкратному замораживанию (-70°C) и оттаиванию (+37°C) для разрушения клеточной и ядерной мембран. Затем в полученных образцах определяли титр вируса методом ТЦД₅₀. Учет результатов проводился на 14 сутки после постановки анализа, титр рассчитывали методом Рида и Менча.

А



Б



В

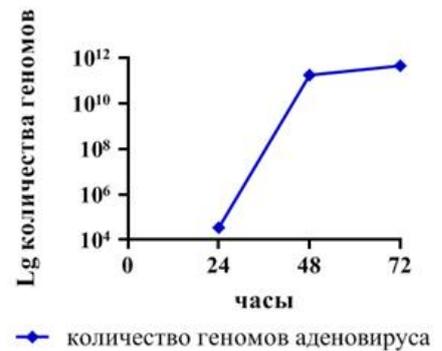


Рисунок 1. Репликация аденовируса SAd25-EGFP в культуре клеток HEK293. А) Кривая роста SAd25-EGFP. На графике обозначены средние значения ($n=2$) \pm стандартное отклонение. Б) Результаты ультрацентрифугирования образцов SAd25-EGFP в градиенте плотности CsCl. В) Количество аденовирусных геномов в образцах после ультрацентрифугирования

Кривая репликации аденовируса SAd25-EGFP представлена на Рисунке 1А. Наблюдается равномерное увеличение количества инфекционных аденовирусных частиц как в клетках, так и в культуральной среде, при этом, наибольшее количество детектировано на 72 ч. Установлено равномерное высвобождение аденовирусных частиц из инфицированных клеток в культуральную среду. Аналогичные результаты наблюдались при заражении аденовирусом SAd25-EGFP 15-см культуральных чашек с 75% монослоем HEK293 в той же дозе (0,03 ТЦД₅₀/клетку). Через 24, 48 и 72 ч собирали клетки с каждой из 8 чашек, вирус концентрировали методом ультрацентрифугирования и количество оценивали визуально в градиенте CsCl (Рисунок 1Б), а также методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (Рисунок 1В). На 48 и 72 ч наблюдалась отчетливая зона опалесценции, содержащая собранные аденовирусные частицы, причем наибольшее количество вирионов при визуальной оценке детектировано на 72 ч, что подтверждалось результатами ПЦР-РВ (Рисунок 1В). Таким образом, аденовирус обезьян 25-го серотипа эффективно реплицируется в культуре клеток HEK293, при этом наибольший выход вируса наблюдался через 72 ч после инфицирования клеток.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОТИПА ГИБРИДНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПРОТИВ ДВУХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ВИРУСА ГРИППА В

Вон П.Ф., Баженова Е.А., Рак А.Я., Исакова-Сивак И.Н.

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Вирусы гриппа В (ВГВ) считаются основными патогенами человека, которые вызывают сезонные эпидемии острых респираторных заболеваний и являются серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Современные лицензированные гриппозные сезонные вакцины включают четыре компонента – штаммы вируса гриппа А (подтипы H1N1 и H3N2), а также два штамма вируса гриппа В: вирусы линии В/Виктория и вирусы линия В/Ямагата. Необходимость включения двух штаммов вируса гриппа В возникла в последнее время ввиду одновременной циркуляции среди людей двух антигенно различных линий ВГВ, которые характеризуются слабой перекрестной реактивностью. Однако для живых гриппозных вакцин (ЖГВ) было показано, что включение четвертого компонента в состав вакцины привело к снижению её иммуногенности и эффективности, по сравнению с трехвалентной ЖГВ, включающей один штамм ВГВ. Соответственно, разработка вакцинного штамма ЖГВ типа В, обладающего перекрестной реактивностью в отношении ВГВ обеих генетических линий, является актуальной задачей современной медицинской науки. В настоящем исследовании конструировали гибридные штаммы ЖГВ типа В, несущие антигенные детерминанты ВГВ двух генетических линий.

Для получения вакцинных штаммов ЖГВ методами обратной генетики все гены холодоадаптированного донора аттенуации для ЖГВ типа В – штамма В/СССР/60/69 (В60) были клонированы в специальные векторы с двунаправленным считыванием. Полученный генно-инженерным путем штамм В60-RG по своим фенотипическим характеристикам не отличался от исходного штамма В60, что открыло перспективы конструирования вакцинных штаммов ЖГВ типа В с помощью стандартных генно-инженерных подходов.

Для конструирования гибридных штаммов ВГВ, экспрессирующих молекулы НА и NA от вирусов линий В/Ямагата и В/Виктория, гены гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA) эпидемических штаммов В/Phuket/3073/13 (В/Ph, линия Ямагата) и В/Brisbane/60/08 (В/Вг, линия Виктория), были клонированы в RG вектор pCIPolISapIT. При помощи трансфекции ко-культивируемых клеток 293Т и MDCK с использованием липофильного агента GenJect-39 (Молекта) были получены два прототипа гибридных вакцинных штаммов, один из которых экспрессирует молекулы НА от вируса В/Вг и NA от штамма В/Ph (НВNP), а второй – НА от вируса В/Ph и NA от штамма В/Вг (НPNB). Также были получены контрольные вакцинные штаммы Вг-RG и Ph-RG, полностью соответствующие классическим вариантам ЖГВ с формулой генома 6:2. Все сконструированные вирусы активно реплицировались в развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK, а также имели температурочувствительный и холодоадаптированный фенотипы, свойственные классическим штаммам ЖГВ типа В.

Иммунизация мышей линии C57BL/6J сконструированными вакцинными прототипами показала активную репликацию вирусов в респираторном тракте животных, соответствующую классическим вакцинным штаммам ЖГВ типа В. После двукратной иммунизации гибридными штаммами у мышей обнаруживались высокие титры антигемагглютинирующих антител к вирусам, содержащим гомологичный НА антиген, при этом не наблюдалось перекрестной реактивности в отношении НА антигена другой генетической линии ВГВ. Однако анализ иммунного ответа методом ИФА с использованием цельных вирусных антигенов в качестве подложки выявил высокий уровень кросс-реактивности вирусспецифических сывороточных IgG антител во всех исследуемых вакцинных группах. При этом комбинация поверхностных антигенов в составе гибридных вакцинных штаммов HBNP и HPNB повышала уровни антител, связывающихся с антигенами В/Ph и В/Br, соответственно, относительно классических вакцинных штаммов Br-RG и Ph-RG. Эти данные указывают на вклад антител к нейраминидазе в общий пул вирусспецифических IgG антител, формируемых при интраназальной иммунизации химерными вакцинными кандидатами, которые могут играть важную роль в защите от заражения гетерологичными ВГВ. Представленная стратегия может быть использована в качестве основы для создания вакцины широкого спектра действия в отношении антигенно-удаленных вариантов вируса гриппа В.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда №23-25-00070.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЛИПИДОВ В СОСТАВЕ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ 2X3-DOPE НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ мРНК *in vitro* и *in vivo*

**Высочинская В.В.^{1,2}, Клотченко С.А.¹, Шишлянников С.М.^{1,2}, Добровольская О.А.¹,
Елиин Н.Д.¹, Елнаева Е.А.¹, Маслов М.А.³**

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

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

³МИРЭА - Российский технологический университет, Москва, Россия

Эффективность терапии на основе нуклеиновых кислот (НК) определяется средством ее доставки в клетки-мишени наряду с корректно подобранной последовательностью РНК. На сегодняшний день липидные композиции считаются одним из наиболее перспективных средств доставки НК. Как правило они представляют собой композицию из катионных, нейтральных и модифицированных (чаще всего полиэтиленгликолем) липидов. В частности, такие мультикомпонентные липосомальные наночастицы (ЛНЧ) одобрены к клиническому использованию FDA в составе мРНК-вакцин против SARS-CoV-2 от компаний Pfizer/BioNTech/Acuitas и Moderna. Несмотря на стремительное внедрение в практику нескольких РНК-вакцин против SARS-CoV-2, задача исследования физико-химических свойств носителей и их биологических эффектов по-прежнему является актуальной. На сегодняшний день активно изучается структура липосомальных систем доставки, и продемонстрированы некоторые аспекты влияния компонентов ЛНЧ и их физико-химических параметров на механизм и эффективность трансфера комплексов липосом с НК в клетку с целью оптимизации их биологической активности.

В настоящем исследовании нами были использованы композиции катионных липосом на основе катионного амфифила 1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид (2X3) и цвитерионного липида 1,2-ди-О-олеоилфосфатидилэтаноламин DOPE. Проведена оценка влияния композиции катионных липом, N/P соотношения (катионный липид/РНК) на физико-химические характеристики липоплексов, их морфологию и эффективность доставки модельной мРНК, кодирующей люциферазу светлячка, в клетки эукариот. Наибольшую эффективность доставки модельной мРНК в экспериментах на клеточных линиях продемонстрировала липидная композиция 2X3-DOPE 1:3. Увеличение доли DOPE в структуре липосом способствует повышению эффективности доставки мРНК. Была проведена оценка влияния модификаций наиболее эффективного носителя 2X3-DOPE 1:3 пегилированными липидами DSPE-PEG(2000) (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] на эффективность доставки модельной мРНК *in vivo* при подкожном введении (Рисунок 1). Максимальную эффективность доставки продемонстрировала липидная композиция 2X3-DOPE 1:3 DSPE-PEG (2%) через 8 часов после подкожного введения. Добавление DSPE-PEG в структуру катионных липосом 2X3-DOPE увеличивает биодоступность комплексов в экспериментах *in vivo*.

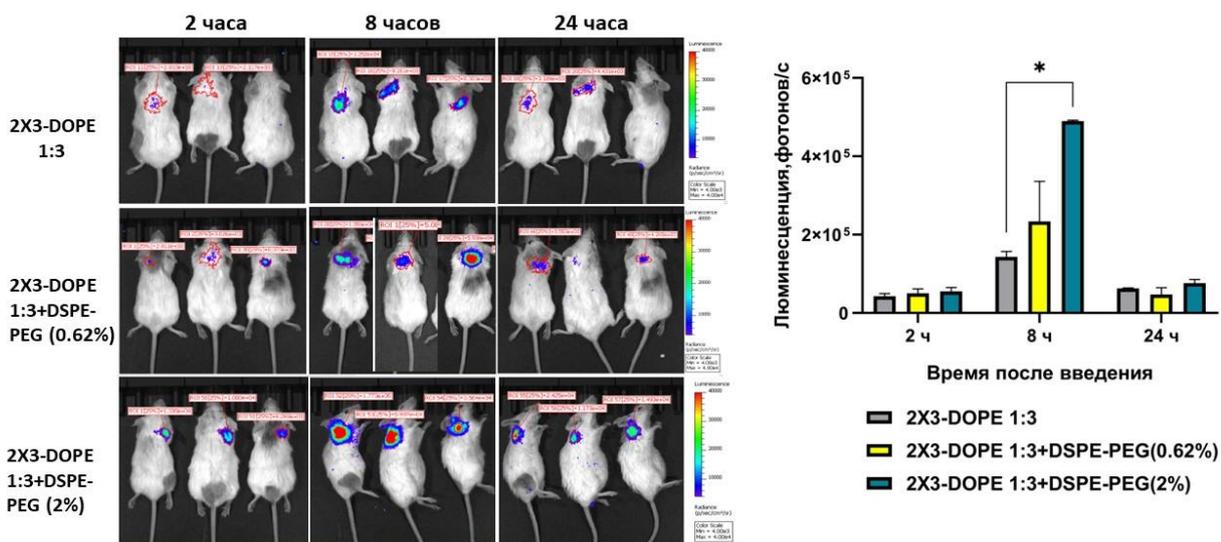


Рисунок 1. Эффективность доставки мРНК, кодирующей люциферазу светлячка, катионными липосомами 2X3-DOPE 1:3, 2X3-DOPE -DSPE-P2000 1:3 (0, 62%), 2X3-DOPE -DSPE-P2000 1:3 (2%) при подкожном введении *in vivo*. Регистрацию биолуминесценции проводили через 2 ч, 8 ч и 24 ч. В правой части каждого изображения расположена линейка псевдоцвета, отражающая распределение интенсивности биолуминесценции (красный - максимальный, синий - минимальный сигнал в относительных световых единицах (RLU))

Катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3+DSPE-PEG представляют собой перспективные средства доставки для последующей разработки мРНК-вакцин.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Гайдаров А.О., Тургиев А.С., Карамов Э.В.

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

Одним из ключевых компонентов понимания вирусных эпидемий является математическое моделирование, сыгравшее положительную роль в описании и предсказании эпидемий гриппа. В настоящее время разработано несколько математических моделей эпидемии COVID-19.

Вспыхнувшая в 2020 году пандемия заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом нового типа SARS-CoV-2, поставила перед многими странами серьезные задачи, которые требовали оперативных, продуманных и обоснованных действий. Помимо необходимых и очевидных решений: закрытие сухопутных границ с зараженными странами, прекращение авиасообщения, мобилизация системы здравоохранения, одной из приоритетных задач стало прогнозирование развития ситуации и составление плана превентивных мероприятий с целью недопущения наиболее неблагоприятного сценария. Значительную роль в этом играют различные математические модели, которые используют накопленный массив данных как о прошедших эпидемиях, так и о текущей, чтобы предсказывать дальнейшее развитие эпидемиологической ситуации. В 2020 году в РФЯЦ-ВНИИТФ с участием специалистов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и НМИЦ ФПИ были разработаны стохастическая агентная модель и модифицированная дифференциальная модель SEIRD, позволяющие описывать распространение вирусной инфекции в мегаполисе. В дальнейшем развитие получила первая модель, описание которой приводится в докладе.

Агентная модель мегаполиса включает в себя алгоритмы генерации популяции и городской среды, алгоритмы описания динамики состояния агентов, сценарии посещения агентами общественных мест и инфицирования при эпидемически значимых контактах. Учитываются приток и отток населения в близлежащие регионы. В динамике состояния агентов отражаются процессы протекания болезни и изменения заразности, формирования и снижения уровня иммунитета, приобретенного в результате болезни или вакцинации. Модель позволяет учитывать регулирующие меры, вводимые для уменьшения негативных последствий эпидемии, и выделять наиболее значимые каналы распространения инфекции для выработки таких мер. В частности, возможен анализ темпов вакцинации населения, необходимых для сдерживания или прекращения эпидемии.

Проведено моделирование развития эпидемии COVID-19 в нескольких регионах России с целью предсказания подъёмов заболеваемости и увеличения нагрузки на систему здравоохранения. Приводятся результаты моделирования по Москве.

СТРУКТУРА СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТИ К ТРЕМ СЕРОТИПАМ АДЕНОВИРУСА ИЗ ПОДГРУППЫ D

Голдовская П.П., Бидина А.Д., Климкина И.А., Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В.

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

Аденовирусы человека (HAdV) вызывают широкий спектр респираторных, желудочно-кишечных, мочеполовых и глазных инфекционных заболеваний. На сегодняшний день идентифицировано более 100 типов HAdV, которые подразделяются на семь подгрупп от А до G. Подгруппа D включает более 70% известных HAdV. Показано, что рекомбинантные векторы на основе HAdV подгруппы D обладают особенностями, такими как безопасность и высокая иммуногенность. Так, аденовирус 26-го серотипа использовался для разработки вакцин для профилактики инфекций, вызванных вирусами Эбола, ВИЧ, Зика и SARS-CoV-2. Поскольку аденовирусы находятся в человеческой популяции, у людей может наблюдаться наличие нейтрализующих антител. В настоящей работе предпринята попытка оценить напряженность иммунитета против трех аденовирусов подгруппы D (Ad19, Ad26 и Ad37) в популяции на одной территории (Москва).

Для оценки серопревалентности к трем серотипам аденовирусов из подгруппы D использовали рекомбинантные аденовирусные векторы, экспрессирующие ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP): rAd19-EGFP, rAd26-EGFP, rAd37-EGFP. Титры вируснейтрализующих антител (ВНА) против данных серотипов HAdV были определены в сыворотках клинических образцов (n=50) в реакции микронейтрализации.

Общая серопозитивность для Ad19 и Ad26 находилась на одном уровне и составила 34%, для Ad37 была несколько ниже - 26%. Среднее геометрическое значение титра ВНА для Ad19 52,12 [95% ДИ:32,69-83,11], для Ad26 94,61 [95% ДИ:56,58-158,2], для Ad37 38,96 [95% ДИ:23,56-64,43] (Рисунок 1В). Клинические образцы были разделены на 4 группы в соответствии со значением титра ВНА (графические данные представлены на Рисунке 1А): отсутствие ВНА (<25), низкий титр ВНА (25-200), средний титр ВНА (400-800) и высокий титр ВНА (>1600). Высокий уровень ВНА (>1600) к Ad26 обнаруживался в 6% случаев, к Ad37 – в 4 % случаев, а к Ad19 отсутствовал. Титр ВНА к Ad26, Ad37 или к Ad19 достигает среднего уровня у 10%, 6% и 2%, соответственно. Низкие титры ВНА наблюдались в 32% образцов для Ad19, в 18% образцов для Ad26 и в 16% образцов для Ad37. Следует отметить, что в большинстве образцов не наблюдалось наличия ВНА: 66% для Ad19 и Ad26 и 74% для Ad37.

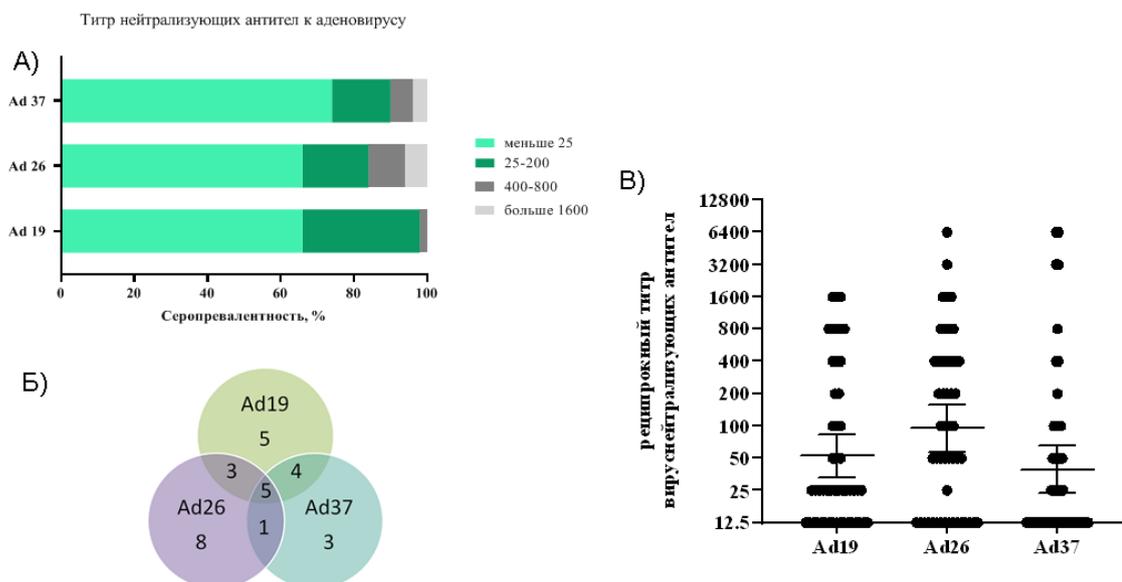


Рисунок 1. А) Уровни ВНА против трех серотипов аденовируса из подгруппы D; Б) количество образцов положительных на один, два или три серотипа HAdV; В) значения титров ВНА к аденовирусам подгруппы D

Кроме того, было проанализировано количество образцов положительных на один серотип, на два серотипа или на все три сразу (Рисунок 1Б). Серопозитивных образцов только на Ad19, Ad26 или Ad37 было 5, 8 или 3 соответственно. Количество образцов, положительных на два серотипа: 3 на Ad19 и Ad26, 4 на Ad19 и Ad37, 1 на Ad37 и Ad26. ВНА ко всем трем Ad мы обнаружили в 5 клинических образцах. В некоторых исследованиях сообщается, что ВНА, специфичные к фиберу аденовируса, могут способствовать перекрестной нейтрализации других серотипов из одной подгруппы и образцы с такими ВНА являются двукратно положительными. Однако проведенные нами ранее исследования наоборот демонстрируют отсутствие перекрестной активности ВНА к вирусам подгруппы D.

В результате исследования была определена серопревалентность к трем серотипам аденовируса из подгруппы D: Ad19, Ad26, Ad37. Анализ структуры серопревалентности выявил следующие закономерности: в большинстве образцов не обнаружено ВНА к исследуемым серотипам аденовирусов, количество серопозитивных образцов к каждому из аденовирусов - приблизительно одинаковое. Такая картина может быть обусловлена тем, что данные серотипы аденовирусов постоянно циркулируют в популяции и сопряжены с конъюнктивитами.

ДНК-МАШИНЫ НА ОСНОВЕ БИНАРНЫХ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ БЕЗАМПЛИФИКАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ SARS-CoV-2

Головина Л.А.¹, Хусейн З.¹, Эльдиб А.А.¹, Колпацников Д.М.^{2,3}, Комиссаров А.Б.⁴

¹*Институт SCAMT, НИУ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

²*Chemistry Department, University of Central Florida, Флорида, США*

³*Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Флорида, США*

⁴*ФГБУ «НИИ группа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Повсеместно используемый метод обнаружения коронавирусной инфекции у пациентов - RT-qPCR (количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) продемонстрировал свои недостатки во время пандемии. Главным образом проблема состоит в его относительно высокой стоимости и длительном времени ожидания результатов теста. И, как следствие, растет спрос на новый, простой, недорогой и чувствительный тест, который сможет обеспечить раннее детектирование вируса.

Бинарные дезоксирибозимы представляют собой совокупность синтетических одноцепочечных молекул ДНК. Данные конструкции являются перспективным методом диагностики разных заболеваний, в том числе коронавирусной инфекции. Это объясняется их высокой чувствительностью, биосовместимостью, стабильностью, низкой стоимостью синтеза, а также простотой прогноза структуры. ДНКзимы также способны усиливать сигнал, генерируемый при сверхурочном обнаружении. Одним из примеров ДНКзимов может быть дезоксирибозим 10-23, расщепляющий РНК. Его бинарная форма считается перспективным молекулярным зондом, поскольку его структура и компоненты позволяют высокоспецифично обнаруживать ДНК или РНК-мишень. Бинарный ДНКзим состоит из двух основных частей, каталитического центра, который расщепляет меченный флуорофором и гасителем репортерный субстрат (f-sub), и аналит-связывающей части. После связывания ДНКзима с целью каталитический центр формируется и расщепляет f-sub, после чего гаситель не может блокировать свечение флуорофора, и свечение можно измерить.

Данное исследование посвящено изучению двух конструкций ДНК-машин, основанных на бинарном дезоксирибозиме 10-23 и нацеленных на РНК вируса SARS-CoV-2. Первый дизайн ДНК-машины включает в себя 4 связывающими мишень участками и системой доставки f-sub в виде двух «крючков», притягивающих субстрат (Рисунок 1А). Второй дизайн представляет собой комбинацию 4 бинарных ДНК-зимов, соединенных между собой (Рисунок 1Б).

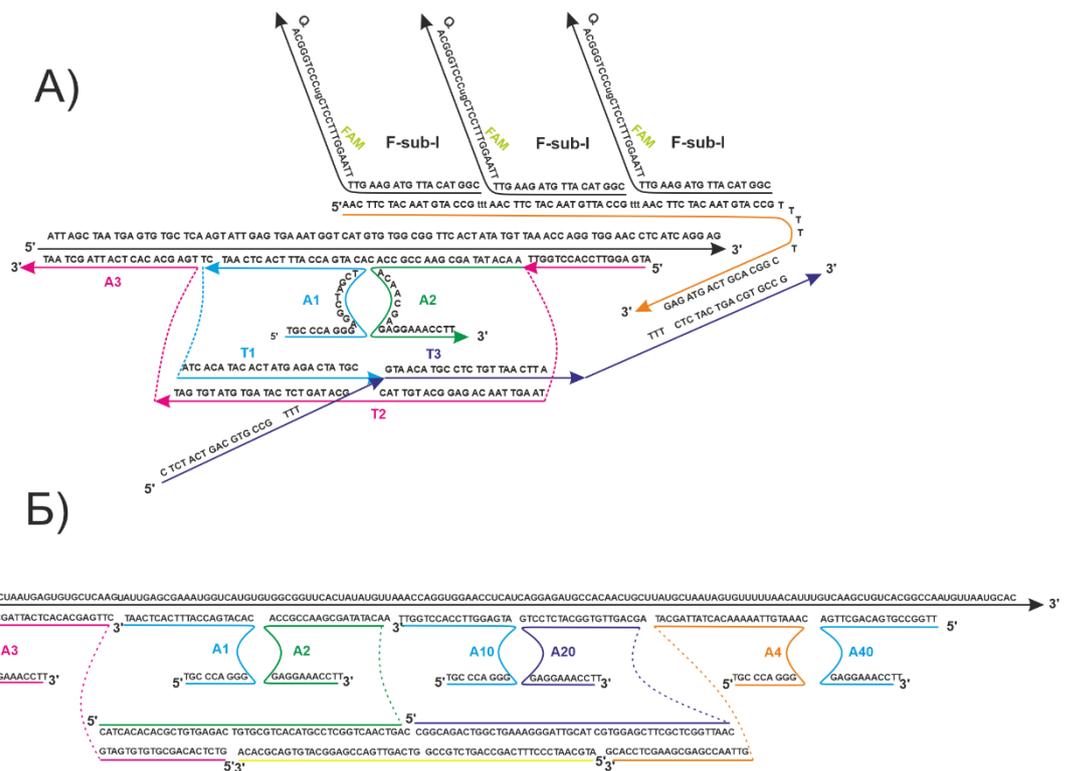


Рисунок 1. Конструкции ДНК-машин

В ходе работы с предложенными дизайнами были подобраны концентрации составляющих конструкцию олигонуклеотидов. ДНК-машины успешно разворачиваются и связываются с вирусной РНК SARS-CoV-2 благодаря дополнительным двум аналит-связывающим участкам в первом дизайне, и благодаря 8 аналит-связывающим участкам во втором дизайне. Конструкции также продемонстрировали значительное снижение предела обнаружения в сравнении с предыдущей ДНК-машиной. Рассчитанный предел обнаружения на синтетическом анализе составил: 1 пМ у ранее опубликованного дизайна, 25 фМ у дизайна, оснащенного «крючками», и 200 фМ у дизайна с 4 каталитическими центрами (все результаты представлены при 3ч инкубации при 55°C). Предлагаемые ДНК-машины также доказали возможность получения эффективного результата за меньшее инкубационное время – 1 ч и 30 мин. Для 4-коровой конструкции были посчитаны пределы обнаружения каждого каталитического ядра в отдельности, что доказало зависимость каталитической активности ядер дезоксирибозимов от последовательности нуклеотидов в дизайне ДНК-машины.

Таким образом, в ходе исследования была доказана эффективность рассматриваемых дизайнов ДНК-машин, а уменьшение времени получения результата открывает перспективу использования данных конструкций в домашних условиях самим пациентом.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ОРИЕНТАЦИИ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА

Горячева А.Н., Ожаровская Т.А., Попова О., Зрелкин Д.И., Зубкова О.В.

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

Существенным фактором, влияющим на эффективность вакцинных препаратов, является выбор наиболее подходящей векторной платформы. Поскольку рекомбинантные аденовирусы в многочисленных клинических исследованиях показали наличие охарактеризованного профиля безопасности и способности индуцировать высокий уровень гуморального и клеточного иммунного ответа, в настоящее время они являются одной из наиболее используемых вакцинных платформ. Кроме того, ценность рекомбинантных аденовирусных векторов для клинического применения зависит не только от их эффективности *in vivo*, но и от возможности крупномасштабного производства препаратов на их основе.

Выбор целевого гена является важным аспектом при создании аденовирусного вектора, однако другие составляющие экспрессионной кассеты также могут влиять на уровень экспрессии целевого гена и, таким образом, на эффективность будущего препарата. Кроме того, в некоторых исследованиях показано, что ориентация кассеты с трансгеном в E1 области генома аденовируса оказывает заметное влияние на рост рекомбинантного аденовируса в культуре клеток. В связи с этим, целью данной работы было исследование влияния ориентации экспрессионной кассеты на репликативные свойства вектора на основе аденовируса человека 26-го серотипа (Ad26). Для этого был использован аденовирус Ad26-S-F, содержащий экспрессионную кассету (CMV-промотор, ген гликопротеина коронавируса и сигнал полиаденилирования) в «прямой ориентации» относительно начала генома, то есть в положении слева направо, а также аденовирус Ad26-S-R с тем же геном, но при этом, экспрессионная кассета располагалась справа налево относительно начала генома («обратная ориентация»).

Для сравнения репликативных свойств данных аденовирусов, были получены препараты, титр которых определяли модифицированным методом титрования по конечным точкам ТЦД₅₀. Далее полученными препаратами инфицировали 24 культуральные чашки диаметром 15 см (на которые высевались клетки почки эмбриона человека НЕК293 в количестве 2×10^7 клеток на чашку) из расчета 0,5 ТЦД₅₀ на клетку. Через 24, 48 и 72 ч собирали клетки с каждой из 8 чашек, подвергали трехкратному замораживанию (-70°C) и оттаиванию (+37°C) для высвобождения вирусного потомства из ядер. Очистку полученных образцов проводили методом ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности CsCl по стандартному протоколу. При обнаружении зоны опалесценции (бенда) на границе растворов с плотностями 1,365 и 1,355 проводили ее отбор стерильным шприцом. Тотальную ДНК из полученных препаратов аденовирусов выделяли с помощью набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (Promega, США). Количество геномов определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

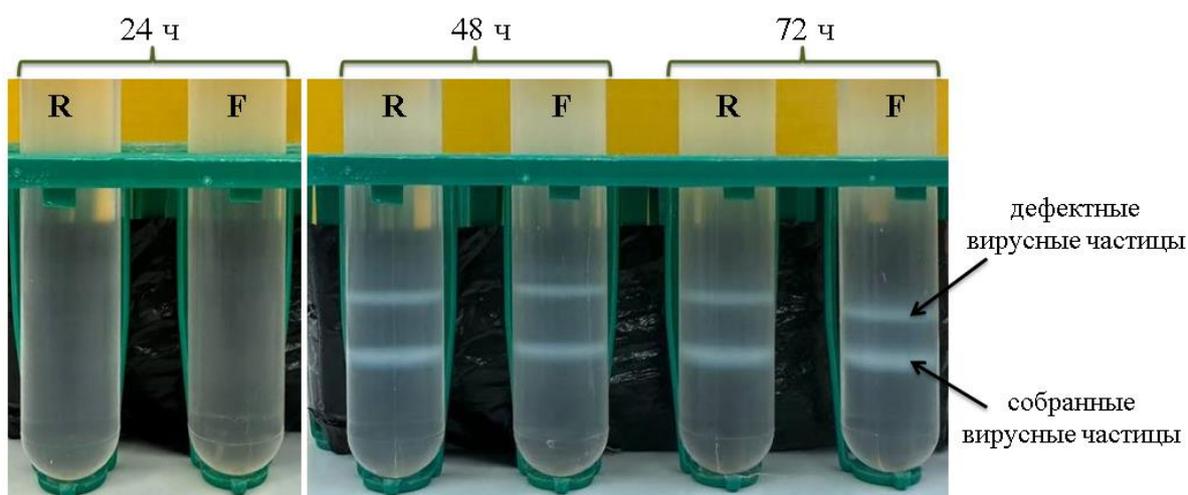


Рисунок 1. Зоны аденовирусных частиц после ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl. R и F – пробы с клеток, зараженных Ad26-S-R и Ad26-S-F, соответственно

Результаты ультрацентрифугирования представлены на Рисунке 1. При визуальной оценке установлено, что через 24 ч после заражения собранных визуально детектируемых аденовирусных вирионов не обнаружено. Через 48 и 72 ч после заражения количество геномов аденовирусов по результатам ПЦР-РВ оказалось в 1,5 и 1,4 раза выше у препарата Ad26-S-R, чем у Ad26-S-F, и составило $(1,42 \pm 0,28) \times 10^{13}$ и $(2,0 \pm 0,04) \times 10^{13}$, соответственно. Количество инфекционных частиц по результатам титрования методом ТЦД₅₀ через 48 и 72 ч после заражения достоверно не отличалось для обоих аденовирусов. Полученные данные показали, что ориентация кассеты в составе аденовирусного вектора не влияет на репликативные свойства аденовируса.

ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОЙ ИНАКТИВАЦИИ СЫВОРОТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ НА ВЫЯВЛЕНИЕ УРОВНЕЙ IgG-АНТИТЕЛ К SARS-CoV-2 И ВИРУСУ ГРИППА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

*Гошина А.Д., Матюшенко В.А., Донина С.А., Меженская Д.И., Рак А.Я.,
Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.*

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Коронавирусы поражают множество различных видов животных и людей, у которых они могут вызывать легкие и тяжелые респираторные инфекции. Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, не только привела к тяжёлым социально-экономическим последствиям, но и стала вызовом для учёных всех стран по созданию более совершенных, безопасных и универсальных вакцин.

Важнейшим этапом разработки любой вакцины является изучение ее иммуногенности как в доклинических исследованиях на лабораторных животных, так и в клинических испытаниях на добровольцах, при этом уровни противовирусных антител чаще всего определяют в иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием индивидуальных вирусных антигенов. В исследованиях гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2 сыворотки крови человека и животных считаются потенциально инфекционным материалом; в связи с этим были приняты рекомендательные меры по тепловой инаktivации образцов при 56°C в течение 1 ч для снижения риска заражения персонала в серологических исследованиях. Однако известно, что данная процедура может влиять на обнаружение вирусспецифических антител класса IgG и IgM при исследовании сыворотки крови человека. Влияние тепловой инаktivации сывороток крови животных при проведении доклинических испытаний вакцин против коронавируса ещё не было зафиксировано.

Цель данного исследования – оценить влияние тепловой инаktivации сывороток крови человека, хорьков и сирийских хомячков на связывание IgG антител с новым коронавирусом SARS-CoV-2 и вирусом гриппа.

Материалы и методы. В исследовании использовали иммунные сыворотки крови человека, хорьков и сирийских хомячков, содержащие вирусспецифические IgG антитела к SARS-CoV-2 и вирусам гриппа. Контрольные группы включали в себя образцы сывороток крови человека и животных, не контактировавших с соответствующим патогеном. Анализировали сыворотки три варианта сывороток крови людей и животных – (i) нативные образцы, (ii) инаktivированные прогреванием при 56°C в течение 1 ч, и (iii) обработанные рецептор-разрушающим ферментом (RDE). Гуморальный иммунный ответ оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков, соответствующих рецептор-связывающему домену S-белка (RBD) и нуклеокапсидному белку (N) SARS-CoV-2, а также цельного вируса гриппа, очищенного на градиенте плотности сахарозы.

Результаты. Показано, что тепловая инактивация наивных сывороток крови хорьков и сирийских хомячков может приводить к появлению ложноположительных результатов, как в отношении антигенов коронавируса, так и в отношении цельного вируса гриппа. При этом как обработка RDE эффективно нивелирует эффект неспецифического связывания IgG антител с вирусными антигенами. Более того, RDE также значительно снижал уровень SARS-CoV-2 и грипп-специфических IgG антител в иммунных сыворотках людей и животных, хотя неизвестно, действительно ли он удаляет истинные вирусоспецифические IgG антитела из иммунных сывороток, или только неспецифически связывающиеся артефакты.

Заключение. Главной причиной появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов может являться температурозависимая перестройка иммуноглобулиновых комплексов вследствие нарушения структуры дисульфидных связей в нативной конформации антител. В конечном итоге это может влиять на avidность комплекса антиген–антитело и приводить к появлению ложных результатов при постановке иммуноферментного анализа. Обработка образцов сывороток крови рецептор-разрушающим ферментом может служить одним из возможных методов снижения риска появления таких «артефактов» и нивелировать эффект тепловой инактивации. При этом обработка RDE также будет нейтрализовать инфекционный вирус, поскольку стандартный протокол включает нагревание образца при 56°C.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №21-75-30003.

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ В МОНИТОРИНГЕ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2

Есьман А.С., Голубева А.Г., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Количество сублиний варианта Омикрон SARS-CoV-2 (B.1.1.529), впервые выявленного в ноябре 2021 года в ЮАР, стремительно растет: в мире выявлено более 600 (данные GISAID – Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data), в России – более 300. По состоянию на январь 2023 года на территории Российской Федерации (РФ), преобладает сублиния BA.5 с постепенным снижением ее доли.

По сравнению с другими вариантами SARS-CoV-2 вызывающими беспокойство (VOC), вариант Омикрон и его подлинии демонстрируют повышенную трансмиссивность и защиту от действия нейтрализующих антител, выработанных в ответ на ранее перенесенное заболевание или вакцинацию, и вызывают многочисленные рецидивирующие и прорывные инфекции.

Полногеномное секвенирование является на сегодняшний день наиболее информативным и предпочтительным методом эпидемиологического надзора за патогенами, однако использование менее сложных (например, секвенирование по Сэнгеру) и наиболее бюджетных методов (ОТ-ПЦР) в мониторинге за вариантами SARS-CoV-2 не теряет своей актуальности.

Согласованная работа специалистов из разных областей, с учетом результатов полногеномного и Сэнгер-секвенирования, использование ПЦР-скрининга при отслеживании вариантов, дает полный эпидемиологический профиль циркулирующего вируса.

Для скринингового типирования сублиний варианта Омикрон методом ПЦР в режиме реального времени выбраны следующие мишени S-гена SARS-CoV-2: delLPP24-26, delHV69-70, T95I, Ins214EPE, L452R, E484A, N501Y, P681R.

При разработке праймеров и зондов для ПЦР методик выравнивание нуклеотидной последовательности для дизайна набора праймер-зонд проводили с помощью программ BioEdit и MEGA. Данные о последовательности полного генома линии Омикрон получены из базы данных GISAID. Для сравнения линий и оценки распространенности мутаций между линиями использованы отчеты Outbreak.info.

Положительные контроли для ПЦР-исследований получены путем клонирования специфических ампликонов с целевыми мутациями в вектор pGEM-T (Promega, США) в соответствии с протоколами производителя. Правильность клонированных последовательностей подтверждена секвенированием по методу Сэнгера.

Образцы биологического материала - мазки/выделения из носоглотки и ротоглотки - исследовали на наличие РНК SARS-CoV-2 с использованием набора реагентов AmpliSens® COVID-19-FL (Amplisens, ЦНИИЭ, Москва, Россия). Выделение РНК проводили методом преципитации нуклеиновых кислот с использованием набора «РИБО-ПРЕП» (Amplisens, ЦНИИЭ, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов РЕВЕРТА-Л (Amplisens, ЦНИИЭ, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, для одностадийной ОТ-ПЦР использовали ревертазу (MM1v) и RT-G-mix-1 (Amplisens, ЦНИИЭ, Москва, Россия).

В результате представленной работы разработан и апробирован мультиплексный формат ПЦР методики, совмещенный с этапом обратной транскрипции для скрининга образцов SARS-CoV-2 и определения принадлежности к одной из сублиний Омикрон, таких как ВА.1, ВА.2, ВА.3, ВА.4/ВА.5, и дифференциации этих сублиний от линии Дельта. Дизайн мультиплекса представляет собой восемь мутаций-мишеней, расположенных в трех пробирках.

Для Mix N501Y+T95I+L452R диагностическая специфичность анализа составила 80-100%, диагностическая чувствительность 93,5-96,3%.

Для Mix delHV69-70+ Ins214ERE+ del26-27 и Mix E484A+ P681R - 88,7-100%/97,8-100% и 93,8-100%/97,8-100% соответственно.

Мультиплекс апробирован на 532 образцах биологического материала, собранных с июля по декабрь 2022 года. Установлена доминирующая роль сублиний ВА.4/5. Полученные результаты позволяют использовать разработанную методику в качестве скринингового инструмента для типирования сублиний SARS-CoV-2 Omicron.

В разработке находятся методики для выявления новых возникающих линий (ХВВ, ВQ* и других).

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭПИТЕЛИИ БРОНХОВ

Карчевская А.А., Ибрагимова М.К., Хозяинова А.А., Цыганов М.М.

НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск, Россия

Актуальность. Установлено, что злокачественные опухоли легких развиваются на фоне прогрессирующих патологических изменений бронхолегочного эпителия, известных как пренеопластические поражения, такие как базальноклеточная гиперплазия (БКГ) и плоскоклеточная метаплазия (ПМ). Считается, что БКГ и ПМ представляют собой физиологически нормальные изменения, протекающие в ответ на повреждение респираторного эпителия, вследствие воздействия факторов внешней среды и/или развития воспалительных процессов. Одним из возможных триггеров воспалительного процесса, и вследствие запуска онкогенеза, является вирусная этиология данного процесса. Показано влияния вирусологических критериев на прогноз течения онкопатологий, связанных с наличием у пациента вируса папилломы человека (ВПЧ). Но изучения наличия ВПЧ в предопухолевых изменениях легких еще не проводилось. **Целью** данной работы явилось определение наличия ВПЧ-инфекции у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с различными типами предопухолевых изменений в эпителии бронхов.

Материалы и методы. В исследование было проанализировано 40 больных с НМРЛ II-III В стадии, центральной и периферической локализации с морфологически верифицированным диагнозом. Для анализа были использованы операционные образцы нормальной (с различными вариантами морфологических изменений бронхиального эпителия) и опухолевой ткани легкого. Выделение ДНК из всех образцов проведено с помощью наборов QIAamp DNA mini Kit («Qiagen», Germany). Анализ показателей ВПЧ-инфицирования определялся методом типоспецифической ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени («AmpliSens», Россия), с помощью системы «Rotor Gene™ 6000» (Corbett Research, Australia).

Результаты. Была оценена частота встречаемости ВПЧ в исследуемых образцах на каждого пациента. Наличие ВПЧ в нормальной ткани легкого с предопухолевыми изменениями было обнаружено у 10 больных (25,0%), а у 30 больных (75,0%) вирус не был выявлен. У ВПЧ-негативных пациентов была проведена повторная процедура выделения ДНК и идентификация ВПЧ в исследуемых образцах. В результате было подтверждено отсутствие ВПЧ у данных пациентов. Преимущественно ВПЧ был обнаружен в образцах только с базальноклеточной гиперплазией (6/10 случаев). У одного пациента наблюдается микст-инфекция с наличием двух типов ВПЧ: 16 и 56. Стоит отметить, что в основном идентифицированы 51 и 56 тип вируса с малозначимой вирусной нагрузкой. Кроме этого, для всех исследуемых пациентов было оценено наличие вируса еще и в опухолевом материале. При этом установлено, что из 10 ВПЧ-положительных пациентов, в опухолевой ткани 16 тип вируса сохраняется только у одного пациента, что скорее всего можно

объяснить значимой вирусной нагрузкой и интегрированной формой. Еще у двух пациентов, в предопухоловой патологии которых ВПЧ обнаружен не был, вирус был идентифицирован в опухолевой ткани.

Заключение. В результате исследования ВПЧ был выявлен среди 25% больных немелкоклеточным раком легкого с предопухоловыми изменениями в эпителии бронхов. Важно отметить, что у ВПЧ-положительных пациентов вирус не был идентифицирован в опухолевой ткани. Данное явление может быть обусловлено так называемым механизмом «Hit-and-run» («Бей и беги»), когда происходит интеграция вируса в клетку с последующей элиминацией вирусного генома. Поэтому даже очень низкая вирусная нагрузка достаточна для запуска канцерогенного процесса в ткани легкого. Что и может являться причиной малигнизации предопухоловых изменений.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА ФИБРИЛЛЫ АДЕНОВИРУСА 5 ТИПА

Коклюшкина А.В., Тимошичева Т.А., Кадырова Р.А., Амосова И.В., Грудинин М.П.

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

Широкое распространение аденовирусных инфекций определяет высокий уровень серопревалентности к аденовирусу (Ад) среди населения, что может повлиять на эффективность вакцин на основе Ад векторов. Наиболее распространённым является вектор на основе Ад 5 типа (Ад5). Выявление антител к Ад проводят с помощью ИФА или реакции нейтрализации (РН), используя инактивированный или живой вирус, соответственно. Использование типоспецифичных синтетических белков в составе ИФА тест-систем может существенно снизить себестоимость анализа, трудо- и время затраты. В лаборатории клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России получен синтетический фрагмент белка фибриллы Ad5 (Adeno5Knob).

Цель: анализ диагностического потенциала синтетического фрагмента белка фибриллы Adeno5Knob в ИФА.

Материалы и методы. Парные сыворотки 60 человек, полученные на «0» и «28» день после иммунизации рекомбинантной вакциной на основе Ад5 вектора исследовали в РН и ИФА на прирост уровня IgG к Ад5. В РН использовали клеточную культуру A549, Ад5 штамм Аденоид 75 в дозе 100ТЦД_{50/50мкл}, сыворотки титровали с шагом 2, начиная с разведения 1:10. Результаты РН учитывали ИФА с использованием моноклональных антител к гексону Ад при длине волны 450 нм (ОП450). Положительным результатом на наличие нейтрализующих антител к Ад5 считали последнее разведение сыворотки, в котором значения ОП450 превышали величину ОП450 отрицательного контроля более чем в 2 раза. Диагностически достоверным считали прирост титра IgG в парных сыворотках более чем в 4 раза.

В ИФА сыворотки использовали в разведении 1:800. В качестве антигенов использовали Adeno5Knob и очищенный Ад5 (оч.Ад5). Диагностически достоверным считали увеличение значения ОП450 в сыворотке, полученной на «28» день по сравнению с сывороткой «0» дня на 0,4 и более оптических единиц.

Результаты. По результатам РН в 39 из 60 парных сывороток кратность прироста уровня антител к Ад5 была диагностически достоверной и составила от 4 до 128 раз. В 11 случаях выявлен 2-кратный прирост титра антител, в 7 случаях титр антител составил 10-320, при этом уровень антител на 28 день не изменялся, 3 пары сывороток были отрицательны.

По результатам ИФА с Adeno5Knob прирост уровня антител к Ад5 выявлен в 28 случаях. Результаты ИФА в 20 случаях совпали с положительными результатами РН. При этом дополнительно выявлено 8 случаев сероконверсий: в 5 случаях из 11 случаев с 2-кратным приростом уровня антител и в 3 случаях из 7 - без прироста уровня антител на 28 день по данным РН.

В ИФА с оч.Ад5 прирост уровня антител выявлен в 21 случае. Результаты ИФА в 15 случаях совпали с положительными результатами РН, дополнительно выявлен прирост уровня антител в 6 парных сыворотках: в 3 парах с кратностью прироста 2 и в 3 парах без изменения уровня антител по данным РН.

Использование Adeno5Knob в качестве антигена для ИФА позволило дополнительно выявить 8 пар сывороток с приростом уровня антител к Ад5 по сравнению с результатами РН. Это обусловлено тем, что Adeno5Knob является типоспецифическим антигеном и использование его в ИФА позволило выявить антитела, образовавшиеся в ответ на введение вакцины на основе Ад5, в то время как РН позволяет определять широкий спектр антител к различным антигенным детерминантам Ад, в том числе и от ранее перенесенных Ад инфекций.

Выводы. Синтетический фрагмент белка фибриллы Adeno5Knob обладает специфической активностью в ИФА и может быть рекомендован для дальнейших исследований и разработок диагностических систем.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА ПО ЗАРАЖЕНИЮ ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ СРЕДИ БЕРЕМЕННЫХ В г. МОСКВЕ

Кольцова И.В.¹, Кистенева Л.Б.¹, Домонова Э.А.², Сильвейстрова О.Ю.²

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

²ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. В настоящее время в Российской Федерации не проводится массовая вакцинация против ветряной оспы (ВО) среди взрослого населения. Это связано с высокой серопозитивностью к ВГЧ-3 лиц старше 18 лет. Тем не менее, иммунизация против ВО отдельных лиц, к которым можно отнести женщин фертильного возраста, не имеющих вирусспецифических антител к ВГЧ-3, является целесообразной.

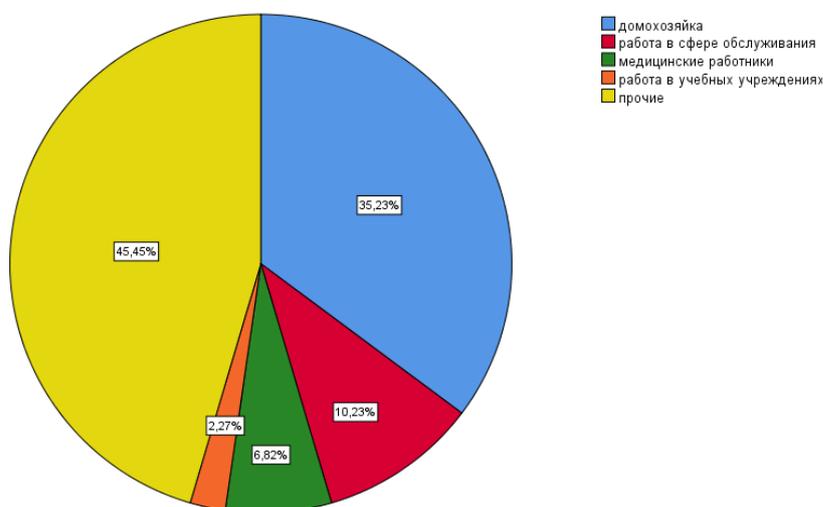
Цель исследования. Определить группы риска по заражению ВО среди беременных пациенток на территории г. Москвы.

Материалы и методы. Проведено анкетирование 84 беременных женщин, заболевших ВО во время беременности и 4 родильниц, заболевших ВО в течение 48 часов после родов. Средний возраст пациенток составил $28,89 \pm 4,98$ лет [95%ДИ 27,83-29,94].

Результаты. Выявлено, что источником инфицирования в 50% случаев (n=44) явились дети: в 36,4% (n=32) - дети самих пациенток, в 13,6% (n=12) - дети из ближайшего окружения. Средний возраст детей составил $5,69 \pm 1,68$ лет [95%ДИ 5,12-6,27]. Профессиональное заражение имело место у одного медицинского работника (1,1%). В 6,8% случаев (n=6) регистрировались прочие источники инфекции (коллеги, взрослые члены семьи и пр.). В 42% случаев (n=37) источник инфекции не был установлен.

Три пациентки (3,4%) сообщили об однократной вакцинации от ВО, 78,4% пациенток (n=69) вообще не знали о возможности вакцинации от ВО, 12,5% (n=11) пациенток были информированы о возможности вакцинации, но не планировали вакцинироваться, 5,7% (n=5) планировали вакцинацию от ВО, но не успели до наступления беременности.

Сфера занятости пациенток представлена на диаграмме:



Потенциальные профессиональные группы риска (медицинские работники, работники учебных учреждений, работники сферы обслуживания с большой клиентской проходимостью) составили 19,32% (n=17) от заболевших. 80,68% (n=71) пациенток составили домохозяйки и работающие пациентки из категории «прочие» (с низким количеством профессиональных контактов). Основным установленным источником заражения для данного контингента также явились дети 54,29% (n=38).

Выводы. Группами риска по заражению ВО являются не только медицинские работники, работники учебных учреждений и сферы обслуживания. Существует риск инфицирования ВО для пациенток, имеющих в окружении детей дошкольного возраста, вне зависимости от профессиональной деятельности. Решением данной проблемы может явиться скрининг на наличие антител к ВГЧ-3 на этапе прегравидарной подготовки и при постановке на учет по беременности с определением круга лиц, подлежащих вакцинации после родов. Очевидной является необходимость просвещения пациенток о возможности и необходимости вакцинации от ВО.

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛЕЙ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

Комиссарова К.С., Елиин Н.Д.

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

Респираторно-синцициальная вирусная (РСВ) инфекция занимает важное место в ряду других респираторных вирусных заболеваний. Наибольшую опасность представляет для детей до двух лет, пожилых людей и людей с иммунодефицитами. Согласно данным ВОЗ, в мире ежегодно заболевает около 33 миллионов детей младшего возраста (до 5 лет) и более 3 миллионов престарелых людей (старше 65 лет) из-за инфекции РСВ. При этом примерно 3-м миллионам детей с РСВ требуется госпитализация, а около 200 000 случаев заканчивается летально. Интерес научного сообщества к РСВ возник довольно давно, но только сейчас под эгидой ВОЗ начинается выстраивание упорядоченной системы надзора за этой инфекцией, которая охватывает все больше стран. Известная база данных GISAID сделала базу EpiRSV, где можно найти данные по генетическим последовательностям, также ресурс Nextstrain.org посвятил РСВ страницу, где можно отслеживать динамику эволюции вируса. Необходимость более пристального наблюдения за этим вирусом обусловлена как наличием моноклональных антител, которые используются для профилактики РС инфекции у недоношенных детей, а также лечения тяжелых форм РС инфекции, так и ожидаемым скорым выходом на рынок вакцин. На данный момент в разработке находится более 20 наименований, в том числе и на последних фазах клинических испытаний. В России тоже на данный момент проводятся клинические испытания нескольких вакцин от РСВ. Важнейшим инструментом генетического надзора за вирусными патогенами являются методы секвенирования нового поколения (NGS). Для увеличения количества вирусного материала в клиническом образце могут использоваться различные способы: гибридизация, концентрирование вирусных частиц при помощи центрифугирования в градиенте, праймерные панели для амплификации. Из всех этих методов наиболее популярным является ПЦР на праймерных панелях, как наименее трудоемкий и бюджетный способ.

Наша команда создала две праймерные панели для полногеномного секвенирования двух подтипов РСВ: РСВ-А и РСВ-В. Каждая панель состоит из 12 пар праймеров, которые амплифицируют участки генома РСВ длиной около 1200 нуклеотидов с небольшим перекрытием на концах ампликонов. Длина 1200 нуклеотидов выбрана неслучайно, подобной длины фрагменты получаются при использовании праймерной панели Midnight для полногеномного секвенирования SARS-CoV-2. Одинаковые длины фрагментов в различных праймерных панелях экономят время и трудозатраты на последующих этапах секвенирования, таких как фрагментация входящей в библиотеку ДНК. Также используя три пары праймеров из наших панелей, можно амплифицировать участки генома РСВ, содержащие последовательности G и F генов, наиболее изменчивых поверхностных гликопротеинов, на основе последовательностей которых определяется генотип конкретного

вируса. Такой материал будет пригоден как для последующего NGS, так и для классического Сэнгеровского секвенирования.

Панель праймеров была валидирована полногеномным секвенированием изолятов РСВ типов А и В: штамм Long и 9320 соответственно. Также панель была опробована на клинических материалах, полученных от пациентов, госпитализированных в больницы Санкт-Петербурга, РСВ был обнаружен в материалах методом ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени, в работу брались материалы с Ct менее 20 (RSVA/Saint-Petersburg/2501/2022 и RSVB/Saint-Petersburg/1044/2022). Секвенирование проводили на Illumina MiSeq и OxfordNanopore. Инструмент Guppy v.6.1 использовался для обработки сырых данных и дебаркодирования последовательностей. Сборка осуществлялась на референс (EPI ISL 412866) при помощи инструмента Minimap2. Samtools and ivar были использованы для создания консенсусных последовательностей. Покрытие последовательностей варьировалось от 10 до 1000 ридов на конкретную позицию, а медиана покрытия была около 100. К настоящему моменту при помощи разработанных праймерных панелей проведено полногеномное секвенирование 19 вирусов РСВ-А, и 13 вирусов РСВ-В. Разработанные панели праймеров пригодны для проведения полногеномной амплификации и секвенирования РСВ как из изолятов, так и из клинических материалов.

ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ХОРЬКОВ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

Кондратьева В.М., Чернорыж Я.Ю., Елисеева О.В., Мусиенко М.И., Латышев О.Е., Шемельков Е.В., Гребенникова Т.В.

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

Возбудитель пандемии COVID-19 эволюционировал в ряд вариантов, вызывающих озабоченность ВОЗ. Новые варианты SARS-CoV-2 продемонстрировали повышенную способность сопротивляться нейтрализующим антителам. Клеточный иммунитет играет центральную роль в контроле над SARS-CoV-2, и точечные мутации вряд ли устранят клеточно-опосредованный иммунный ответ, поскольку рецепторы Т-клеток распознают более тысячи эпитопов. Животные модели, включая трансгенных мышей, несущих ген рецептора ACE2 человека, сирийские хомяки, хорьки и приматы используются для доклинического анализа вакцин и терапевтических средств. Хорьки являются золотым стандартом для изучения патогенности и передачи респираторных вирусов человека.

Данное исследование направлено на изучение формирования клеточного иммунитета у хорьков при интраназальном введении вакцины против COVID-19 на основе вирусоподобных частиц (VLP).

Исследуемые вакцины вводили трехкратно интраназально по 0,25 мл в каждый носовой ход. Количество антигена (VLP) составило 80 мкг и 120 мкг на животное. В качестве плацебо использовали 0,9% раствор натрия хлорида. Введение вакцин проводили с интервалом 14 дней: на 0-й, 14-й и 28-й дни эксперимента. Кратковременную седацию проводили с целью профилактики чихания (препарат «Ксила» в дозе 1 мг/кг).

Образцы цельной крови отбирали через 7 дней после 2-й и 3-й иммунизации в объеме 2,0 мл. Пролиферацию лимфоцитов оценивали в РБТЛ через 3-4 суток. Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП), рассчитанного как отношение среднего числа лимфобластов, наблюдаемых в присутствии и в отсутствии специфических стимуляторов. Положительным считали результат, если ИСП >2.

Исследование Т-клеточного иммунитета было проведено с использованием вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19, созданного по рекомбинантной технологии. Антиген вакцины составляли наночастицы, собранные из рекомбинантных белков, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии. При этом они имитируют вирион SARS-CoV-2, но не содержат нуклеиновой кислоты. Каждая частица состоит из 4-х белков коронавируса – S, M, E, N. При этом, в качестве поверхностных антигенов в нее включены S белки эпидемически значимых генотипов SARS-CoV-2, включая кланды Альфа, Дельта и Омикрон.

Проведен анализ клеточного иммунного ответа у хорьков на введение вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19 в двух дозах – 80 мкг/доза и 120 мкг/доза. Отбор

крови и исследование в реакции РБТЛ проводили до иммунизации и на 7 сутки после второй и третьей иммунизации (Рисунок 1).

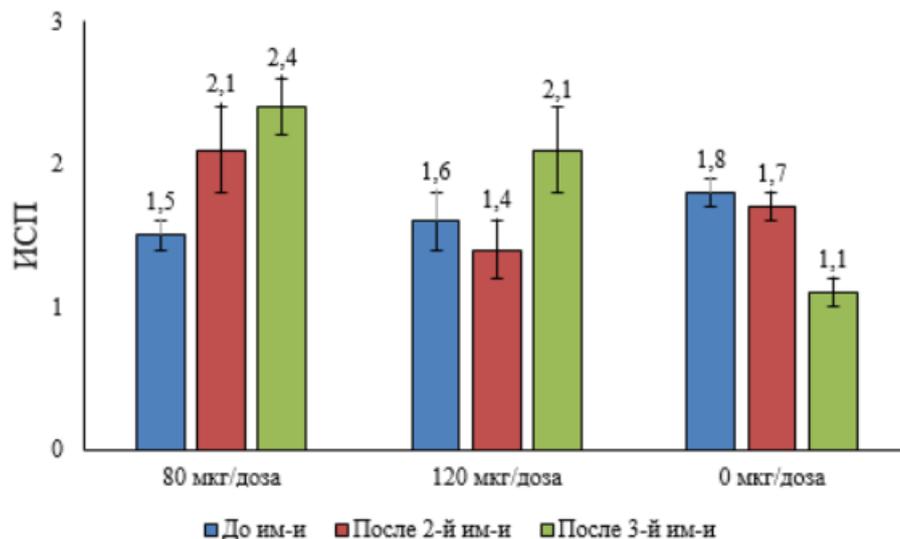


Рисунок 1. Динамика ИСП, $M \pm SEM$

Двукратная иммунизация VLP вакциной стимулирует пролиферацию лимфоцитов у хорьков в концентрации 80 мкг/доза, среднее значение ИСП $2,1 \pm 0,3$; при концентрации 120 мкг/доза среднее значение ИСП было ниже порогового значения и составило $1,4 \pm 0,2$, что статистически значимо отличается от группы плацебо ИСП $1,01 \pm 0,04$ ($p < 0,05$), но не выше порогового значения равного 2. После третьей интраназальной иммунизации хорьков VLP вакциной в концентрации 120 мкг/доза отмечается увеличение ИСП до $2,1 \pm 0,3$, но различие по сравнению с ИСП до иммунизации ($1,6 \pm 0,2$) статистически не значимо ($p > 0,05$). Достоверное увеличение (почти в два раза) среднего значения ИСП ($2,4 \pm 0,2$) по сравнению с ИСП до иммунизации ($1,5 \pm 0,1$) отмечалось после третьей иммунизации VLP вакциной в концентрации 80 мкг/доза ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о формировании специфического клеточного ответа у хорьков при интраназальном введении вакцины против COVID-19 на основе вирусоподобных частиц VLP в концентрации 80 мкг/доза.

ТАРГЕТНАЯ NGS-ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Корюков М.А.^{1,2}, Кечин А.А.^{1,2}, Гордукова М.А.³, Кузнецов В.Е.¹, Храпов Е.А.¹,
Субботин С.В.¹, Филипенко М.Л.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Детская городская клиническая больница №9 им. Г.Н. Сперанского, Москва, Россия

Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются одной из лидирующих причин заболеваемости и смертности во всем мире. Несмотря на преимущественно умеренное течение болезни, нередки осложнения, особенно среди пациентов с иммунодефицитом или хроническими заболеваниями органов дыхания, кровообращения и центральной нервной системы. Диагностика ОРИ часто основана только на клинической картине, вследствие чего при лечении могут использоваться малоэффективные и потенциально опасные препараты. На данный момент для диагностики респираторных инфекций активно используются такие методы, как иммунохроматографический и иммуноферментный анализы, однако золотым стандартом диагностики большинства респираторных инфекций является полимеразная цепная реакция (ПЦР). При этом ключевым недостатком общим для этих методов является ограниченность в применении при работе с большим количеством образцов и целевых патогенов. Одним из наиболее актуальных методов при работе с высокомультиплексированными системами является секвенирование нового поколения (NGS). Использование индексирующих последовательностей представляет возможность одновременного анализа сотен образцов на наличие различных патогенов за один запуск секвенатора. На данный момент существует несколько зарубежных коммерческих тест-систем для диагностики респираторных заболеваний на основе секвенирования, однако их аналогов в РФ до сих пор нет. Поэтому целью данной работы стала разработка NGS-панели для детекции инфекционных агентов, встречающихся в клинических образцах пациентов с симптомами ОРИ. Для этого из базы данных NCBI Nucleotide были извлечены последовательности нуклеиновых кислот 12 видов бактерий и 39 групп вирусов, на которые было сконструировано 108 пар праймеров. Эффективность работы праймеров была оценена в моноплексных ПЦР с последующим разделением продуктов амплификации с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. В силу отсутствия положительного контроля для некоторых патогенов не были проверены праймеры: *Coxiella burnetii*, *Chlamydia pneumoniae*, эховирусы, аденовирусы типа E, вирусы парагриппа 1 типа, вирус кори, паротита, ветряной оспы и тяжелого острого респираторного синдрома. По результатам 40 запусков секвенирования на приборе Illumina MiniSeq была предложена методика приготовления библиотеки, а также анализа данных при помощи программы Qiime2. В сотрудничестве с ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского нами было протестировано 90 образцов кДНК, которые

были предварительно проанализированы на наличие респираторных вирусов при помощи ПЦР тест-системы – ОРВИ-скрин (Хеликс). При применении NGS-панели в 82% образцов был обнаружен хотя бы один из целевых патогенов, в то время как при использовании ОРВИ-скрин доля положительных образцов достигла лишь 23%. По результатам NGS среди образцов наблюдалась высокая частота случаев коинфекции, преимущественно *H. influenzae* и *S. pneumoniae* (12%). Также были идентифицированы различные варианты микст-инфекций, в состав которых входили риновирусы и метапневмовирусы. Несмотря на эффективную идентификацию многих групп вирусов и бактерий, были отмечены определенные проблемы в идентификации герпесвирусов и аденовирусов. Таким образом сконструированная NGS-панель позволяет детектировать большую часть патогенов респираторной системы человека.

ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ГРИППА КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

Котомина Т.С., Матюшенко В.А., Меженская Д.А., Кудрявцев И.В., Прокопенко П.И., Матушкина А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) является второй по значимости причиной смертности младенцев и представляет угрозу для людей старше 65 лет. Традиционные подходы к созданию вакцин против РСВ оказались не эффективными. В 60-е годы после иммунизации формалин-инактивированной вакциной (ФИ-РСВ) и заражением РСВ в естественных условиях умерли два младенца. Векторные вакцины рассматриваются как альтернатива в данном вопросе. Вирусные векторы различаются по кинетике проникновения в организм, степени репликации и профилю экспрессии белков, что формирует разные уровни иммунного ответа и защитный потенциал. В данном исследовании впервые в качестве вирусного вектора для создания вакцины против РСВ использовались штаммы лицензированной живой аттенуированной гриппозной вакцины (ЖГВ). Были разработаны четыре варианта векторных вакцин ЖГВ-РСВ для индукции преимущественно В-клеточного, либо Т-клеточного иммунного ответа против РС вируса, используя модельный вакцинный штамм ЖГВ подтипа H7N9. В первом и втором вариантах иммуногенная кассета, содержащая эпитоп РСВ-F₂₄₃₋₂₉₄ с нейтрализующей активностью, встраивалась с N-конца молекулы НА через гибкий линкер AAAPGAA (ЖГВ-РСВ/А), либо GGGGSGGGGS (ЖГВ-РСВ/Г). Методом молекулярного моделирования показано, что у кандидата ЖГВ-РСВ/Г более выгодная пространственно-конформационная организация эпитопов, чем у ЖГВ-РСВ/А, что способствует лучшему связыванию со специфическими антителами. Наравне с ЖГВ, векторные вакцины с В-эпитопом обладали температурочувствительным и холодоадаптированным фенотипом в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). В третьем и четвертом вариантах иммуногенная кассета состояла из эпитопов РСВ-M2 с Т-клеточной активностью, и соответствующая генетическая последовательность инкорпорировалась в модифицированный ген NA вируса гриппа к С-концу с помощью мультигенной системы экспрессии P2A (ЖГВ+NA/РСВ), либо в ген NS1 белка вируса гриппа после участка, где расположена 126-тая аминокислота, через сайт P2A (ЖГВ+NS1/РСВ). Векторные вакцины с Т-эпитопами РСВ были температурочувствительными, но утратили свойство холодоадаптированности в РКЭ.

Иммуногенность и защитную эффективность ЖГВ-РСВ оценивали с использованием мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель. ЖГВ-РСВ вводили интраназально в дозе 10^6 log₁₀ ЭИД₅₀/50 мкл с интервалом в три недели. Через три недели после последней вакцинации проводили челлендж вирусом гриппа A/Shanghai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A, либо РСВ А2. При иммунизации мышей ЖГВ-РСВ/А и ЖГВ-РСВ/Г не реплицировались в легких, были высокоиммуногенными и эффективно защищали мышей от вируса гриппа. Эти варианты оказались неиммуногенными и не защищали мышей от

размножения РС вируса в легких после челленджа. В то же время гистопатологические изменения тканей легких после челленджа были менее выражены в группах ЖГВ-РСВ/А и ЖГВ-РСВ/С, чем в группе мышей, привитых формалин-инактивированной вакциной (ФИ-РСВ). При иммунизации мышей кандидатами ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ вирус не реплицировался в легких. Эти кандидаты были иммуногенными и эффективными в отношении вируса гриппа. Вакцинация ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ индуцировала выработку РСВ-М2 специфичных CD8 Т-клеток, сдерживала вирусную нагрузку после заражения РСВ А2 и не провоцировала патологию легочной ткани по сравнению с ФИ-РСВ. При выяснении механизмов, лежащих в основе защитного эффекта, была изучена субпопуляция тканерезидентных Т клеток памяти (T_{RM}) в легких. Оба варианта ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ стимулировали выработку РСВ-специфичных и грипп-специфичных $CD69^+CD103^+CD8$ и $CD4$ эффекторных Т-клеток памяти в легких.

Резюмируя вышесказанное можно заключить, что выбранная стратегия по встраиванию нейтрализующего эпитопа РСВ в геном ЖГВ оказалась слабоэффективной для обеспечения защиты против РС инфекции. Векторные вакцины, разработанные для индукции Т-клеточного иммунного ответа против РСВ, индуцируют клеточно-опосредованный иммунитет в легких, благодаря чему обеспечивается защита против вируса гриппа и РСВ, не приводя к патологическим изменениям в тканях легких после натуральной инфекции.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РИНОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2020-2021 гг.

*Ксенафонтов А.Д.¹, Писарева М.М.¹, Едер В.¹, Мусаева Т.Д.¹, Фадеев А.В.¹,
Комиссаров А.Б.¹, Киселева И.В.^{2,3}*

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

²ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Риновирусы – одни из самых распространенных респираторных вирусов. Это сферические, безоболочечные, РНК-содержащие вирусы. Риновирусы относятся к семейству *Picornoviridae*, роду *Enterovirus*. Риновирусы делятся на три вида: А, В, С. В зависимости от рецепторной специфичности, риновирусы видов А и В (HRV-A и HRV-B) подразделяются на основные, рецепторно-специфичные к молекуле клеточной адгезии ICAM-1, и второстепенные, специфичные к рецептору липопротеинов низкой плотности LDLR. Риновирус С (HRV-C) прикрепляется к рецептору CDHR3. На данный момент известно 80 типов HRV-A, 32 типа HRV-B и 57 типов HRV-C.

К основным симптомам риновирусной инфекции относят ринорею, заложенность носа, риносинусит, боли в горле, головные боли, недомогание. Также отмечаются осложнения в виде бронхоолита, внебольничной пневмония и астмы.

Геном риновирусов представлен одноцепочечной +РНК длиной около 7,2 тысячи нуклеотидов.

Мониторинг вирусов-возбудителей ОРВИ в разных странах демонстрирует приблизительно одинаковую картину преобладания в циркуляции риновирусов, при этом самым распространенным является вид HRV-A.

В литературе есть данные о видовом разнообразии риновирусов в разных уголках мира. Однако их разнообразие на территории Санкт-Петербурга не изучено. При этом риновирус является одной из главных причин ОРВИ. Следовательно, изучение видового и типового разнообразия риновирусов в данном регионе является актуальным и новаторским.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе лаборатории молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. Образцы (мазки из носо- и ротоглотки) доставляли из Клинической инфекционной больницы им. С. П. Боткина, Детской городской больницы Св. Ольги, Детской городской клинической больницы №5 им. Н.Ф. Филатова в рамках проекта по госпитальному надзору за гриппом (GISHN), а также в работу брались образцы от амбулаторных пациентов, поступившие в лабораторию с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. Детекцию риновирусов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени коммерческими наборами «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование генетического разнообразия риновирусов осуществлялось секвенированием по методу Sanger с использованием праймеров, разработанных *L. CostaSouza* и соавт. (2021).

Из базы данных GenBank для выравнивания полученных последовательностей были взяты последовательности полных геномов риновирусов. Выравнивание последовательностей проводилось в программе MAFFT v7.515. Филогенетическое дерево построено в программе RAxML v.8.2.12, методом максимального правдоподобия, модель нуклеотидных замен GTR+G. Визуализация проводилась в FigTree v1.4.4.

Результаты. В период с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. детектировано 396 образцов, положительных на риновирус (128 положительных в рамках проекта GISHN). Из них 70 было типировано. Низкий процент типирования связан с более низкой чувствительностью секвенирования по методу Sanger, в сравнении с ПЦР в реальном времени, которым проводилась детекция образцов.

Самым распространенным оказался HRV-A. Детектировано 38 HRV-A, то есть 54% от общего числа типированных образцов. Был выявлен 21 тип HRV-A. Среди типов практически не встречалось повторений. Наиболее распространенным типом (9 образцов) оказался HRV-A46 (24% от всех обнаруженных HRV-A).

HRV-B и HRV-C детектировано по 16 риновирусов (23% каждого вида от общего числа типированных риновирусов).

Среди HRV-B обнаружено 8 типов. Самый распространенным оказался HRV-B06 (33% от всех обнаруженных HRV-B).

Среди HRV-C также детектировано 8 типов. Самыми распространенными типами оказались HRV-C11, HRV-C32 и HRV-C15, по 19% каждого.

Заключение. Согласно полученным данным, генетическое разнообразие риновирусов на территории Санкт-Петербурга достаточно велико. Поскольку риновирусные инфекции могут приводить к серьёзным последствиям (таким, как астма), изучение их разнообразия является актуальным, а вклад самого вируса в эпидемиологическую ситуацию существенно недооценён.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЧАСТИЧНОГО НОКАУТА ГЕНА *SNORD93* В КЛЕТКАХ A549 НА ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Кудря К.С.¹, Сергеева М.В.¹, Журавлев Е.С.², Матвеева А.М.², Степанов Г.А.²

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

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Малые ядрышковые РНК (мякРНК) относятся к группе некодирующих РНК. По наличию консервативных элементов в нуклеотидной последовательности мякРНК делятся на два класса: С/D-бокс-мякРНК (SNORD), которые участвуют в 2'-О-метилировании и Н/АСА-бокс-мякРНК (SNORA), катализирующие процесс псевдоуридилрования рРНК. Известно, что некоторые SNORD/SNORA участвуют в различных этапах жизненного цикла вирусов. Например, SNORA и SNORD могут активировать сплайсосомные малые ядерные РНК, что способствует правильному сплайсингу и трансляции вирусных белков. Также было показано, что при подавлении экспрессии клеточных С/D-бокс-мякРНК происходит ингибирование вирусной репликации.

Целью данного исследования являлась оценка влияния частичного нокаута гена *SNORD93* в клетках A549 на их чувствительность к гриппозной инфекции.

Материалы и методы. Исходные клетки A549 (ATCC #CCL-185) и клоны с нокаутом культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 1% GlutaMAX и 10% эмбриональной сыворотки при 37°C, 5% CO₂. Клетки в 24-луночных планшетах заражали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR8) (коллекция НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева) в дозе 0,05 ТИД₅₀/клетку. После заражения каждые 12 часов собирали аликвоты культуральной жидкости для определения инфекционной активности вируса методом титрования в клеточной культуре MDCK, а также собирали клетки для определения доли зараженных методом проточной цитометрии при окрашивании флуоресцентно мечеными антителами к NP белку вируса гриппа. Эксперимент проводили в трех биологических повторах.

Результаты исследования. На основе клеточной линии A549 методом CRISPR/Cas9 ранее были получены клоны с нокаутом гена *SNORD93*. В данном исследовании использовали клон 18 с частичным нокаутом и контрольный клон 30 без целевой мутации, прошедший все этапы редактирования, но несущий дикий тип гена-мишени. Исходные клетки A549 и контрольный клон 30 характеризовались быстрым ростом, стандартной морфологией и небольшой гетерогенностью размеров клеток. В тоже время клон 18 с частичным нокаутом *SNORD93* рос медленнее, популяция клеток была более гомогенной без клеток большого размера.

Для определения чувствительности клеток к инфекции вирусом гриппа использовали два параметра: количество новообразующихся вирусных частиц в инфицированных клетках и доля зараженных клеток. Заражающую дозу подбирали в предварительном эксперименте таким образом, чтобы в исследуемом временном диапазоне наблюдать динамику обоих

показателей. Исходные и мутантные клетки заражали вирусом гриппа A/PR8, далее в течение 36 ч проводили отбор проб для оценки титра вируса и процента клеток, положительно окрашенных на вирусный белок NP. Результаты исследования представлены на Рисунке 1.

Полученные результаты позволяют заключить, что частичный нокаут *SNORD93* снижает восприимчивость клеток A549 к гриппозной инфекции A/PR8, что выражается как в сниженном числе зараженных клеток, так и в сниженном титре новообразующегося вируса.

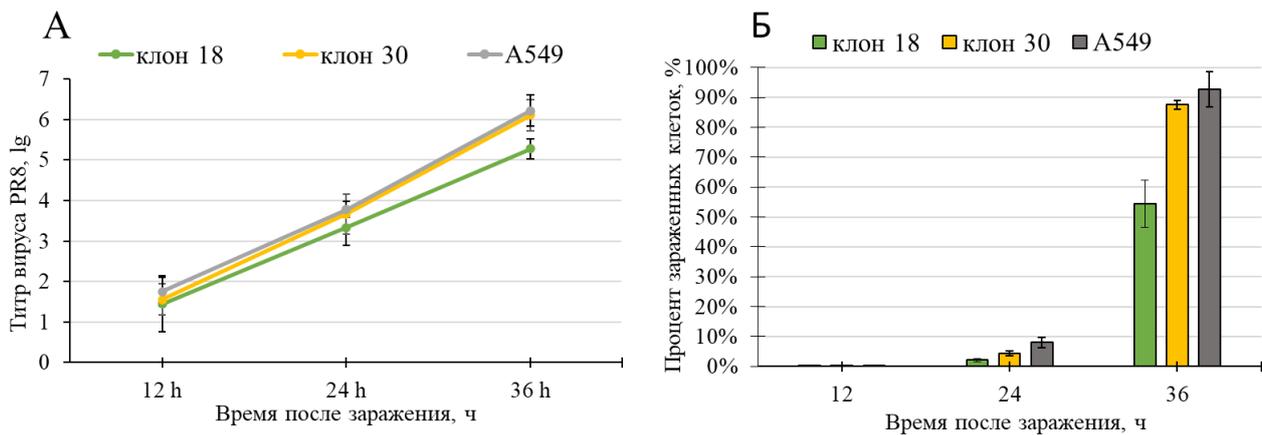


Рисунок 1. Чувствительность исходных клеток A549, клон 30 (внутренний контроль), и клон 18 с частичным нокаутом *SNORD93* к инфекции вирусом гриппа A/PR8. А – Инфекционная активность вируса в культуральной среде, Б – Доля клеток, положительных на вирусный белок NP

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ IFN-λ *in vivo* НА МОДЕЛИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, ОСЛОЖНЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Ложков А.А.^{1,2}, Шишлянников С.М.^{1,2}, Плотникова М.А.²,
Добровольская О.А.², Клотченко С.А.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

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

Актуальность. Большая часть смертельных исходов от вируса гриппа А (ВГА) связана со вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Одним из наиболее распространенных возбудителей вторичной бактериальной пневмонии является *Staphylococcus aureus*. IFN-λ могут оказывать негативное влияние при сочетанной гриппозной и бактериальной инфекции. Пролиферация клеток респираторного эпителия II типа наблюдается на 6-8 сутки после заражения, что коррелирует со сроками элиминирования гриппозной инфекции и набором массы тела мышами. В этот временной период в бронхоальвеолярной жидкости присутствуют IFN-λ, которые способны ингибировать пролиферацию и дифференцировку клеток легочного эпителия. С другой стороны, в целом ряде исследований показана противовирусная активность IFN-λ по отношению к ВГА *in vitro* и *in vivo*. В этой работе была предпринята попытка оценить, насколько введение IFN-λ по профилактической схеме способно не только подавлять репродукцию ВГА, но и оказывать влияние на течение вторичной бактериальной инфекции.

Цель работы – оценить протективное действие рекомбинантных IFN-λ1 и IFN-α2b человека *in vivo* при профилактическом интраназальном введении при сочетанной гриппозной и бактериальной инфекции.

Схема постановки эксперимента. Биоактивность интерферонов определяли по их способности подавлять цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита в культуре клеток Vero. Дозы вводимых интерферонов выравнивали по их биоактивности, такая доза составляла 5500 ED₅₀/мышь.

В исследование было включено 5 групп, по 17 животных в каждой, и группа интактного контроля (10 мышей). Рекомбинатные интерфероны вводили за сутки до инфицирования ВГА. В качестве негативного контроля использовали препарат плацебо (PBS). Также, в исследование была включена группа «Вирусный контроль». В этой группе мыши были инфицированы только ВГА, но не были затем заражены *Staphylococcus aureus*. В качестве положительного контроля использовали препарат сравнения «Тамифлю», который относится к противовирусным препаратам прямого действия и подавляет развитие гриппозной инфекции, не влияя при этом на течение бактериальной инфекции.

В силу того, что мыши линии Balb/c дефектны по гену Mx1, и в значительной мере подвержены гриппозной инфекции, было принято решение использовать сублетальную модель инфекции. Мышей заражали штаммом A/Aichi/2/68 (подтип H3N2), в дозе 0,5 МЛД₅₀. На первый день после заражения ВГА, в объеме 50 мкл на мышь интраназально вводили

среду, содержащую бактерии *Staphylococcus aureus* в количестве 10^6 КОЕ/мл. На 3-й день эксперимента часть подопытных животных умерщвляли, определяли бактериальную нагрузку и уровень белка NP ВГА в легких инфицированных мышей. Массу оставшихся животных измеряли ежедневно, отслеживали их летальность.

Результаты. Среди мышей, получавших IFN- λ 1, не было летальных случаев и была отмечена только незначительная потеря массы тела (не более 5%) при сочетанной гриппозной и бактериальной инфекции. Наоборот, применение IFN- α 2b было ассоциировано с увеличением летальности (по критерию Мантеля-Кокса) и выраженной потерей массы тела. Одной из возможных причин такого результата могут быть иммуномодуляторные эффекты от действия IFN- α 2b. Более того, интраназальное введение IFN- λ 1 приводило к достоверному снижению бактериальной нагрузки (более чем в 5 раз по сравнению с препаратом плацебо) в гомогенатах тканей легких (Рисунок 1). Достоверное снижения уровня белка NP ВГА было показано только для препарата сравнения («Тамифлю»), но не для рекомбинантных интерферонов.

Заключение. Интраназальное введение IFN- λ 1 человека по профилактической схеме оказывает протективный эффект в модели сочетанной сублетальной гриппозной и бактериальной инфекции. Хотя введение IFN- λ 1 и не приводило к снижению уровня NP ВГА, оно было ассоциировано со снижением числа бактерий *Staphylococcus aureus* в гомогенатах легких.

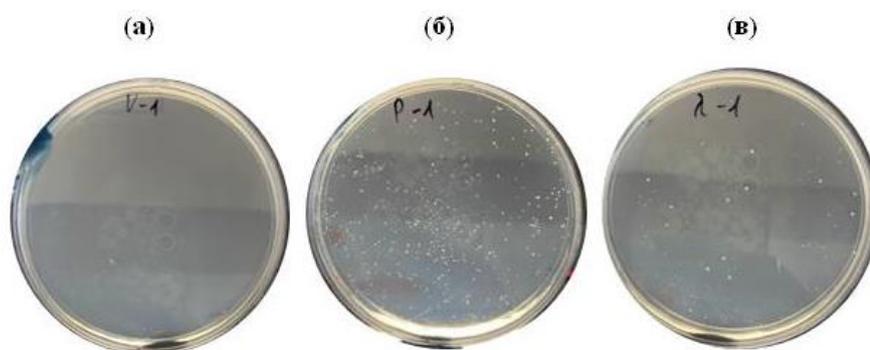


Рисунок 1. Рост бактериальных колоний на плотной агаризованной среде спустя 16 часов после посева 10-ти кратного разведения гомогената легких мышей из групп: (а) «Вирусный контроль»; (б) препарат плацебо (PBS); (в) рекомбинантный IFN- λ 1 человека.

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА

Макимова А.Ю.¹, Плотникова М.А.², Клотченко С.А.²

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

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

Введение. Грипп – острое респираторное заболевание, которое вызывает сезонные эпидемии, а иногда и пандемии. Точная диагностика гриппа имеет решающее значение для инфекционного контроля возбудителей ОРВИ, а также для выбора тактики лечения больного. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) является репрезентативным молекулярным анализом с очень высокой чувствительностью и специфичностью, но этот метод занимает несколько часов, является трудоемким и требует использования специфического оборудования. Представленное исследование посвящено разработке и оптимизации теста на основе петлевой изотермической амплификации с использованием *Bst*-полимеразы с вытесняющей активностью. Преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости в использовании термоциклера, уменьшение стоимости анализа, кроме того, этот подход может быть реализован в формате диагностического экспресс-теста «у постели больного».

Методы. Для разработки праймеров был выбран наиболее консервативный сегмент вируса гриппа А (ВГА) – NP. Три пары вырожденных праймеров для выявления всех подтипов ВГА, циркулирующих в человеческой популяции, были подобраны с использованием программного обеспечения NEB LAMP Primer Design Tool и синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Россия). В качестве положительных образцов в работе были использованы РНК и κДНК штаммов вируса гриппа А/California/07/09pdm (H1N1pdm09), А/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) и А/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), в качестве отрицательных образцов – РНК, выделенная из клеток A549, не инфицированных ВГА.

Для проведения LAMP с флуоресцентной детекцией использовали ферменты *Bst* 3.0 (NEB, #M0374) и *Bst* ДНК полимеразу, большой фрагмент (*Bst*LF, Биолабмикс, #E-10002), а также соответствующие буферы к ним. Детекцию результатов проводили в режиме реального времени, считывая флуоресценцию (SYBR Green) через каждые 2 минуты с использованием CFX96 Touch (Bio-Rad). LAMP с колориметрической детекцией проводили с использованием смеси WarmStart LAMP kit (NEB, #E1700). Детекцию осуществляли визуально по изменению окраски реакционной смеси с розового на желтый. Реакцию проводили со стандартным количеством праймеров (FIP/BIP – по 1,6 μM; F3/B3 – по 0,2 μM; Loop F/Loop B – по 0,4 μM) в объеме 25 мкл при 65°C в течение 1–2 часов.

Стандартные калибровочные кривые были получены с использованием очищенных из геля конкатемеров (κДНК размером около 214 п.н.).

Результаты. Первоначально проводили LAMP с колориметрической детекцией для выявления вирусной РНК в различных концентрациях. Колориметрическая LAMP не давала

ложноположительных результатов, однако, иногда при малых концентрациях вирусной РНК положительная реакция наступала спустя достаточно продолжительное время (2 часа и более). Поэтому для оценки чувствительности тест-системы и определения пороговых значений были построены калибровочные кривые. Для расчета нижних детектируемых концентраций был применен математический подход, используемый для расчета эффективности реакции стандартных ПЦР. В случае LAMP понятие цикла неприменимо, поскольку реакцию проводят при одной и той же температуре – 65°C, вследствие этого на оси ординат указано время появления положительных результатов. При проведении реакции LAMP в течение 1 часа 30 минут нижние пределы детекции для конкатемера, полученного для ВГ A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) составили 0,126 фг (примерно 0,0008 аМоль), для ВГ A/California/07/09pdm (H1N1pdm09) – 55,621 фг (примерно 0,37 аМоль). Различия, вероятно, обусловлены вырожденностью использованных праймеров. Предположительно, чувствительность LAMP с колориметрической детекцией будет ниже. На следующем этапе работы планируется оценить специфичность и чувствительность LAMP с использованием образцов (назофарингеальных мазков), полученных от пациентов с подтверждённым ПЦР-тестом на грипп, а также апробировать метод LAMP без предварительного этапа экстракции вирусной РНК.

Заключение. Разработанная нами тест-система LAMP (набор праймеров) имеет большой потенциал для использования в клинической диагностике, в том числе при создании высокочувствительных экспресс-тестов для качественного выявления вирусов гриппа А.

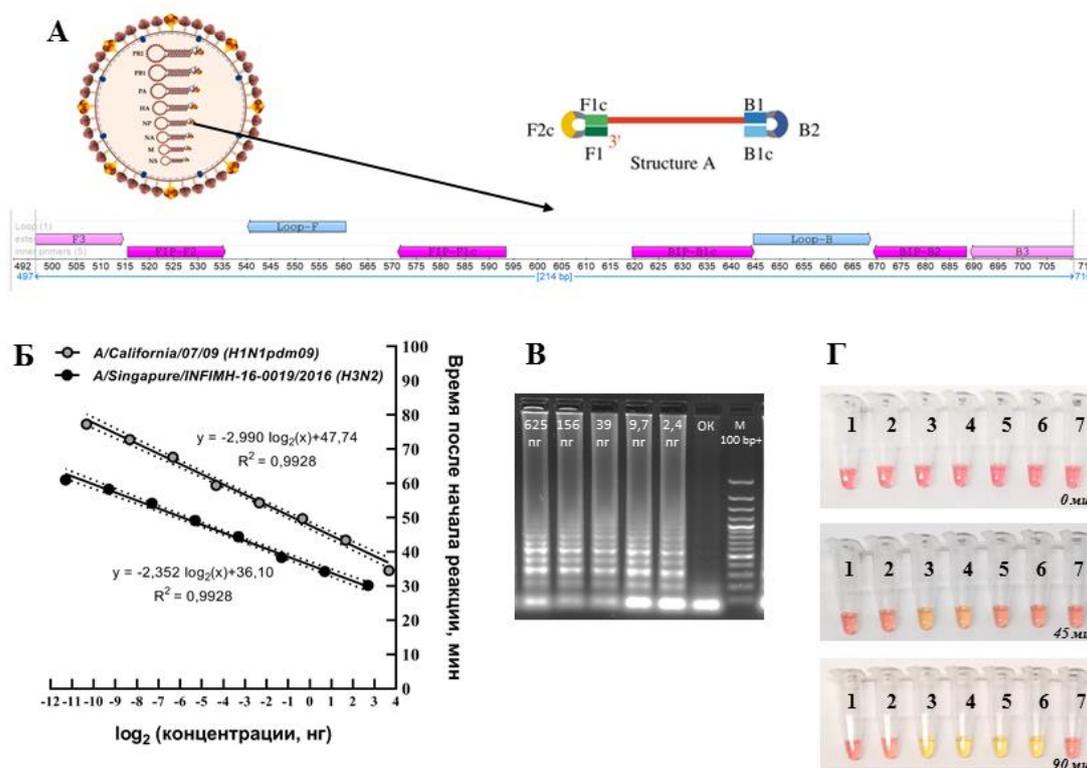


Рисунок 1. Тест-система LAMP для детекции ВГА. А – схема расположения подобранных праймеров, специфически выявляющих сегмент NP ВГА. Б – стандартные калибровочные кривые, полученные с использованием конкатемеров ВГ

A/California/07/09pdm (H1N1pdm09) и A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2). В – Результаты электрофоретического разделения продуктов LAMP: первые пять дорожек соответствуют четырехкратным разведениям стандартной калибровочной кривой для ВГ A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), далее идет отрицательный контроль и маркер GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific). Г – результаты LAMP с колориметрической детекцией: пробы 1, 2 – РНК, выделенная из интактных клеток A549; 3, 4 – РНК ВГ A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), 1 нг и 0,01 нг, соответственно; 5, 6 – РНК ВГ A/California/07/09pdm (H1N1pdm09), 1 нг и 0,01 нг, соответственно; 7 – отрицательный контроль (вода). Сверху – вид пробирок сразу после раскапывания, в середине – через 45 минут, внизу – через 2 часа после начала реакции.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПАРАГРИППА ТРЕТЬЕГО ТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

*Мансур У.^{1,2}, Фадеев А.В.¹, Комиссарова К.С.¹, Комиссаров А.Б.¹, Потехин А.А.²,
Лиознов Д.А.¹*

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Одной из частых причин ОРВИ у новорожденных и детей младшего возраста, а также среди пожилого населения является вирус парагриппа человека, который относится к семейству парамиксовирусов (Paramyxoviridae), родам Respirivirus (hPIV-1 и 3) и Rubulavirus (hPIV-2 и -4). Это оболочечные цитоплазматические вирусы с одноцепочечной несегментированной (-) РНК, длина которой около 15 тыс. п.о.. hPIV является этиологическим фактором развития различных респираторных заболеваний, к числу которых относятся ринит, отит, лариноготрахеобронхит и пневмония. Вирусный геном кодирует шесть основных белков (3'-N-P-M-F-HN-L-5'). Поверхностный гликопротеин HN вируса парагриппа является крайне интересным объектом исследования. Данный белок участвует в таких важных процессах как распознавание клетки-хозяина, участие в слиянии, высвобождение вируса из клетки. Необходимо отметить, что этот поверхностный гликопротеин обладает наиболее высокой антигенной вариабельностью среди всех белков вируса парагриппа.

Генетическая вариабельность вирусов парагриппа, циркулирующих на территории России, не была изучена. Целью данной работы являлась молекулярно-генетическая характеристика вирусов парагриппа 3 типа, циркулирующих в Санкт-Петербурге.

В работе использованы назофарингеальные мазки от пациентов, собранные в период с ноября 2022 г. по февраль 2023 г. в СПб ГБУЗ КИБ им. С.П. Боткина и СПб ГБУЗ «ДГБ Св. Ольги». Детекцию вирусов парагриппа осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени при помощи коммерческих наборов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производство ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификация гена HN вирусов парагриппа проводилась согласно протоколу Park et al., 2014. Полученные ампликоны секвенировали с использованием Oxford Nanopore. Полные последовательности генов hPIV3 (длиной 1719 нуклеотидов), кодирующих белок HN, были получены для четырех вирусов (hPIV3/Russia/SPE-RII-4142/2022, hPIV3/Russia/SPE-RII-10322/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-11934/2023, hPIV3/Russia/SPE-RII-12146/2023. Множественное выравнивание последовательностей проводили с помощью инструмента MAFFT, Для филогенетического анализа использовали программу IQ-TREE2 – метод максимального правдоподобия (ML), модель TIM+F+I+R3, бутстреп – 1000 репликаций.

Согласно результатам филогенетического анализа исследованные вирусы из Санкт-Петербурга относились к генетическому подкластеру С3. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей изученных вирусов показал 17 аминокислотных

замен между исследованными вирусами и референсным штаммом C243 (Washington/1957), и 8 аминокислотных замен в сравнении с референсным штаммом 754 (Oklahoma/2009). Ни одна из обнаруженных аминокислотных замен не была локализована в известных антигенно значимых участках молекулы. Также обнаруженные замены относительно референсных штаммов генетических подгрупп не приводили к изменению профиля потенциальных сайтов N-гликозилирования. В настоящее время генетическая гетерогенность вирусов парагриппа человека в России является малоизученной, необходимы дополнительные исследования для оценки генетического разнообразия циркулирующих вирусов.

ОЦЕНКА РЕПЛИКАТИВНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОГЕННЫЕ ФРАГМЕНТЫ РЯДА РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ В ГЕНАХ НА, NA И NS

*Матушкина А.С., Матюшенко В.А., Степанова Е.А., Котомина Т.С., Руденко Л.Г.,
Исакова-Сивак И.Н.*

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) – многообещающая векторная система для доставки и презентации антигенов различных респираторных вирусов. Преимущества использования ЖГВ в качестве вирусного вектора хорошо известны. Среди них: стабильность РНК-генома вируса гриппа, аттенуированный фенотип, контролируемый множественными мутациями, возможность использования среди детей, интраназальное введение, индукция гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, стимуляция системного и местного иммунитета слизистой оболочки. Идентифицировано несколько генов вируса гриппа, толерантных к встраиванию чужеродного генетического материала. Если вакцина разрабатывается для индукции нейтрализующих антител, целевой эпитоп может быть встроен в белок НА или NA, так, чтобы эпитоп экспонировался на поверхности вирусной частицы. Если необходимо встроить Т-клеточный эпитоп, выбирают один из генов вирусов гриппа, таким образом, чтобы происходил независимый процессинг вирусного белка и встроенного чужеродного фрагмента. При встраивании Т-клеточных эпитопов в рамку считывания усеченного NS1 белка можно добиться дополнительной аттенуации, нарушая функцию NS1 белка как антагониста интерферонов I типа. Однако внесение чужеродной генетической информации в геном штамма ЖГВ может оказывать влияние на репликативные свойства вакцинного вируса и на экономическую целесообразность наработки поливалентной вакцины в производственных масштабах.

В настоящем исследовании проводили сравнительный анализ ростовых характеристик ряда рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ, кодирующих в своем геноме иммуногенные фрагменты различных возбудителей ОРВИ, по-отдельности или в различных комбинациях: (1) аденовирус человека (вставка размером 119 а.о., содержащая С-концевой домен белка гексона аденовируса и два мышинных H2-b и H2-d эпитопа); (2) респираторно-синцитиальный вирус (RSV) (вставка длиной 68 а.о., содержащая нейтрализующий эпитоп F белка, и вставка размером 65 а.о., включающая иммуногенные Т-клеточные эпитопы белка M2-1); (3) метапневмовирус человека (hMPV) (вставка размером 133 а.о., содержащая антигенные сайты IV, V, VI F белка); (4) сезонные коронавирусы (вставка размером 118 а.о., включающая Т-клеточные эпитопы N белка бета-коронавирусов и фрагмент S2 белка альфа-коронавирусов); (5) риновирус человека (вставка длиной 127 а.о., содержащая Т-клеточные эпитопы белка капсида VP1). Фрагменты RSV-F и hMPV-F встраивали с N-конца молекулы НА вируса гриппа, тогда как Т-клеточные эпитопы различных вирусов кодировались в рамках считывания NA белка либо укороченного до 126 а.о. NS1 белка, через сайт саморасщепления P2A.

Химерные вирусы гриппа получали путем трансфекции клеток Vero целевым набором плазмид, с последующим накоплением жизнеспособных вариантов в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Репликативные свойства рекомбинантных штаммов оценивали в системе РКЭ. Эмбрионы заражали десятикратными разведениями вируса и инкубировали при разных температурах 33°C, 38°C, 26°C. Титр вируса рассчитывали по методу Reed&Muench и выражали в lgЭИД₅₀/мл.

Было показано, что встраивание антигенных участков RSV-F и hMPV-F в молекулу гемагглютинина не оказывало влияния на способность вирусов реплицироваться при всех изученных температурах. Встраивание генетических конструкций в рамку считывания NA белка также не влияло на ростовые характеристики рекомбинантных вирусов, тогда как аналогичные вставки в гене NS1 приводили к сниженной репликации при 26°C. Важно отметить, что у всех сконструированных вариантов сохранялся температурочувствительный фенотип, который определяет безвредность вакцины для привитых. Поливалентные вакцинные штаммы, кодирующие одновременно три фрагмента целевых респираторных вирусов (RSV/AdV/Cor и RSV/Cor/RhV, с модифицированными генами HA/NA/NS1), имели в значительной степени сниженные инфекционные титры при всех температурах инкубации по сравнению с векторным контролем. Эти данные указывают на ограниченную вместимость генома вакцинных штаммов ЖГВ для дизайна поливалентной вакцины от ОРВИ, и необходим тщательный отбор целевых эпитопов для обеспечения максимальной иммуногенности вакцины с сохранение ее репликативных свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПОДТИПА А/Н1N1 К КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK

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

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Ежегодно вирус гриппа поражает 3-5 миллионов человек во всем мире, число смертельных случаев заболевания при этом варьируется от 290 до 650 тысяч. Самым эффективным способом защиты от гриппа считается специфическая вакцинация. В настоящее время в практике здравоохранения используется три типа гриппозных вакцин – живые аттенуированные (ЖГВ), инактивированные (ИГВ) и белковые рекомбинантные вакцины. ЖГВ и ИГВ преимущественно производятся на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), однако в последние десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что позволит в короткие сроки набирать большие объемы вирусной биомассы, а также сузит список противопоказаний, в частности, позволив применять вакцину лицам, страдающим аллергией на куриный белок. Также было показано, что культуральная ИГВ обладает лучшим защитным эффектом по сравнению с вакциной, произведенной в РКЭ.

В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ разрешено использование эпидемических вирусов, выделенных на РКЭ, и сам процесс реассортации также осуществляется в этой системе культивирования. Такие вакцинные штаммы могут быть использованы и для производства вакцины на культурах клеток млекопитающих, однако на сегодняшний день не проводилось глубокого детального изучения адаптационных мутаций, которые могут появиться в антигенных детерминантах вируса в процессе производства культуральной ЖГВ.

В работе был использован вакцинный штамм А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (Калиф17), содержащий гемагглютинин и нейраминидазу от пандемического вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09). Адаптацию вакцинных штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK проводили при их последовательном 5-кратном пассировании, за которым следовало клонирование вируса на культуре клеток методом бляшек. Для этого выбирались 20-30 хорошо отделяемых друг от друга бляшек на предельных разведениях, и из каждой выделенной бляшки изолировали отдельный клон вируса, который затем накапливали на культуре клеток MDCK и полностью секвенировали гены поверхностных белков.

После адаптации Калиф17 к культуре клеток MDCK было выделен и проанализирован 21 клон, и после секвенирования генов гемагглютинина и нейраминидазы в каждом из вариантов был выявлен один из трех наборов аминокислотных отличий в молекуле гемагглютинина: (i) N156D в субъединице HA1 (обозначен как Калиф17-1), (ii) A44V в субъединице HA2 (обозначен как Калиф17-4) и (iii) комбинация N156D в HA1 и A44V в HA2 (обозначен как Калиф17-8). При этом через два накопительных пассажа штаммы Калиф17-1 и Калиф17-4 стали идентичны штамму Калиф17-8, т.е. приобрели каждую соответствующую дополнительную мутацию. Этот феномен говорит о том, что мутации N156D в HA1 и A44V в

HA2 в вирусе H1N1pdm09 могут быть взаимосвязаны давать преимущество вакцинному вирусу при его накоплении в культуре клеток MDCK. Это предположение подтверждают данные по исследованию репродукции вакцинных штаммов Калиф17, представленные на рисунке. В системе РКЭ инфекционные титры вирусов Калиф17, Калиф17-1, Калиф17-4 и Калиф17-8 составляли 8,0; 6,6; 7,1 и 8,2 lg ЭИД₅₀/мл, соответственно. При этом клоны Калиф17-1 и Калиф17-4 размножались в 8-40 раз хуже исходного варианта Калиф17 и клона Калиф17-8. Тогда как в культуре клеток MDCK инфекционные титры тех же вирусов составляли 6,3; 6,2; 7,3 и 7,6 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно, из чего следует, что в культуре клеток получили преимущество клоны Калиф17-4 и Калиф17-8: они стали размножаться в 10-20 раз лучше исходного вируса Калиф17.

Таким образом, мутации N156D в субъединице HA1 и A44V в субъединице HA2 оказывают существенное влияние на репликативные свойства вакцинного штамма H1N1pdm09 в культуре клеток MDCK, что может сказаться на объемах производства вакцины в промышленных масштабах. В дальнейших исследованиях будет оцениваться влияние обнаруженных мутаций на антигенные и иммуногенные свойства вакцинных штаммов.

ВСТРАИВАНИЕ ЭПИТОПА M2E В АНТИГЕННЫЙ САЙТ МОЛЕКУЛЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТОТИПА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Меркурьев А.В.^{1,2}, Меженская Д.А.², Исакова-Сивак И.Н.², Руденко Л.Г.²

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

²*ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия*

Вирус гриппа представляют большую угрозу для людей и животных, вызывая и по сей день эпидемии по всему миру. По данным ВОЗ ежегодно от гриппа погибает около 650 тысяч людей в мире. Главной причиной ухода гриппа от иммунного ответа является его постоянная изменчивость, которая реализуется геномной реассортацией и ошибками в работе полимераз.

В настоящее время основным средством борьбы с распространением данного вируса является вакцинация. Существует множество лицензированных противогриппозных вакцин, которые отличаются между собой механизмами индукции иммунного ответа, но зачастую они обладают низкой эффективностью ввиду того, что иммунитет формируется в основном к наиболее вариабельным антигенам вируса. Альтернативным подходом по предотвращению распространения вирусов гриппа является создание универсальных гриппозных вакцин, которые обладают кросс-протективной активностью в отношении различных штаммов вируса гриппа.

Основной стратегией по созданию универсальных вакцин с широким спектром действия является индукция усиленного иммунного ответа к консервативным участкам вируса гриппа. Одним из таких участков является эктодомен белка M2 (M2e), однако данный фрагмент сам по себе является слабым иммуногеном, и предлагается множество стратегий по усилению его иммуногенности.

В данной работе для создания нового прототипа универсальной гриппозной вакцины проводилось встраивание фрагмента M2e в наиболее иммуногенный участок молекулы гемагглютиниона (HA) – в его глобулярный домен. Для этого методами обратной генетики была получена рекомбинантная плаزمиды, несущая полноразмерную копию HA штамма А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1), и имеющая вставку последовательности фрагмента M2e в Sb-эпитопе глобулярного домена. Далее с использованием такой модифицированной плазмиды был получен жизнеспособный рекомбинантный вакцинный штамм 17/PR8/M2e на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В качестве контрольного штамма был получен реассортантный штамм 17/PR8, поверхностные молекулы которого принадлежали штамму А/Пуэрто Рико/8/34, а гены внутренних и неструктурных белков – донору аттенуации Лен/17.

В результате исследования характеристик вакцинных штаммов в системе *in vitro* было показано отсутствие влияния дополнительной вставки M2e на репликативные свойства рекомбинантного штамма по сравнению с немодифицированным контролем, а также на его температурочувствительный и холодоадаптированный фенотипы. Двукратная иммунизация

мышей BALB/c сконструированными вирусами приводила к выраженной индукции M2e-специфических антител у варианта 17/PR8/M2e, но не 17/PR8, что указывает на иммуногенность консервативного эпитопа M2e, экспонированного в составе молекулы HA на поверхности вирусной частицы. Дальнейшая оценка сконструированного химерного штамма 17/PR8/M2e в экспериментах по защите иммунизированных мышей от различных гетерологичных вирусов гриппа А позволит обосновать перспективность использования новой стратегии для создания универсальной живой гриппозной вакцины.

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ В РОССИИ

Мишкин А.А., Афонина Н.М., Лысенков В.Г., Надтока М.И., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Перспективы внедрения вакцинопрофилактики ветряной оспы в России требуют изучения генетического разнообразия возбудителя с целью разработки и/или выбора наиболее эффективных вакцинных препаратов, соответствующих по составу протективных антигенов циркулирующим вариантам «дикого» вируса.

Цель: оценить возможность применения молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом надзоре за ветряной оспой

Методы. С помощью разработанных в лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора праймеров для выделения и амплификации отдельных сегментов вируса ветряной оспы проведено секвенирование 12 образцов, полученных в июне-сентябре 2022 года от больных ветряной оспой, проживающих в одном микрорайоне городского округа Красногорск Московской области.

Результаты. Установлено, что в июне-сентябре 2022 года в микрорайоне заболевания ветряной оспой были вызваны вирусами, отнесенными к разным кладам – 3 (50% образцов), 1 (41.7%) и 5 (8.3%), причем вирусы различных генотипов определяли в образцах, полученных одновременно (в один и тот же день) от разных больных. Выявлено, что образцы вируса от больных ветряной оспой детей из одного и того же очага ветряной оспы в детском учреждении или семейного очага инфекции относились к одной и той же кладе (3). В то время как у ребенка, проживающего в микрорайоне, но посещающего детский сад в г. Москве, был идентифицирован вирус ветряной оспы, относящийся к кладе 5. Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено генетическое разнообразие возбудителя ветряной оспы, циркулирующего в конкретный период времени на отдельной территории. Продемонстрирована возможность применения разработанной методики в системе эпидемиологического надзора за ветряной оспой для установления эпидемиологических связей между случаями заболевания.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Монахов Н.Э.^{1,2}, Сизова Н.В.¹, Ермаков А.И.¹, Лиознов Д.А.²

¹ СПб ГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Санкт-Петербург, Россия

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

Цель: оценить генетическое разнообразие ВИЧ 1-го типа у пациентов, получающих антиретровирусную терапию.

Методы. Проведено молекулярно-генетическое исследование 288 образцов плазмы крови больных ВИЧ-инфекцией, наблюдавшихся в СПб ГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» в 2020 году.

Анализ фрагментов гена *pol*, кодирующего ферменты: протеазу (кодоны 1–99), обратную транскриптазу (кодоны 1–273) и интегразу (1–288), выполнен на анализаторе ABI Hitachi 3500xl («Applied Biosystems Inc.», США), с использованием набора реагентов ViroSeq HIV-1 («Celera Diagnostics», США).

Последовательности ВИЧ-1 субтипированы с использованием референс-программ REGA HIV-1 Subtyping Tool Version 3.46 и COMET HIV-1/2 Version 2.4. При получении противоречивых результатов и выявлении рекомбинантных форм вируса, дополнительно использовался инструмент HIV BLAST международной базы данных института Лос-Аламос.

Результаты. Средний возраст больных составил 39,7±7,7 лет (от 16 до 66 лет), в выборке преобладали мужчины – 65,3%. Код обследования «по клиническим показаниям» и «при обращении за медицинской помощью» для подтверждения ВИЧ-инфекции встречался чаще – 29% и 16%. Основным путем передачи ВИЧ в исследованной группе оказался половой – 58,3%. Доля потребителей инъекционных наркотиков составила – 40,3%, вертикальная передача возбудителя – 1,4% случаев.

У всех больных регистрировали вирусологическую неэффективность в двух и более измерениях вирусной нагрузки ВИЧ с интервалом в 1 месяц на фоне приема АРТ. На момент проведения теста резистентности уровень репликации вируса варьировал от 118 до 5 620 428 коп/мл (медиана lg 4,47±1,01).

В результате генотипирования ВИЧ-1 установлено, что субтип А6 остается наиболее распространенным штаммом в Санкт-Петербурге – 89,6%. На долю других вариантов приходилось 10,4%, из них субтип В – 6,6%, субтип С – 0,3% и рекомбинантные штаммы ВИЧ – 3,5%. Циркулирующие рекомбинантные формы представлены 4 случаями – CRF63_02A6 и по 2 случая – CRF01_AE, CRF02_AG, CRF06_cpx.

Среди инфицированных субтипом А6 преобладали пациенты с гетеросексуальным путем инфицирования ВИЧ – 96,6% (143/148), инъекционным – 92,2% (107/116) и вертикальным – 100% (4/4). Среди МСМ доминирующим вариантом оказался субтип В – 65,0% (13/20).

Согласно данным эпидемиологического анамнеза в 13,2% случаев (38 чел.) установлена возможная миграция возбудителя из других регионов страны: 17 пациентов прибыло из СФО, 12 из ЦФО и по несколько случаев из других Федеральных округов.

Выводы. В следствие неуспеха антиретровирусной терапии сохраняется риск передачи резистентных вариантов возбудителя, что обуславливает необходимость проведения эпидемиологического надзора за распространением циркулирующих вариантов ВИЧ.

Разнообразие субтиповой принадлежности, вероятно, связано с миграционными и рекомбинационными процессами возбудителя в популяции. Доля новых случаев инфицирования ВИЧ не-А субтипом составила – 10,4%. При высокой частоте обнаружения субтипа А6 (89,6%) не выявлена зависимость от пути передачи ВИЧ, в отличие от субтипа В, для которого был характерен гомосексуальный путь инфицирования. В 13,2% предполагается завозные случаи ВИЧ-инфекции из других регионов страны.

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И ТЕХНОЛОГИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

*Морозова Н.Е.¹, Потысьева А.С.¹, Ведяйкин А.Д.¹, Арсениев А.Н.¹, Мельников А.С.¹,
Сердобинцев П.Ю.¹, Курдюмова И.В.¹, Криворучко А.Б.²,
Якунина М.В.¹, Ходорковский М.А.¹*

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

²*Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

Появление новых и развитие существующих инфекционных заболеваний является одним из основных вызовов человечеству. На сегодняшний день необходимость быстрого и точного выявления инфекций на ранней стадии заболевания с целью предотвращения их дальнейшего распространения является одной из приоритетных задач. Такую диагностику необходимо проводить на рабочих местах, в образовательных учреждениях, при совершении междугородних и международных поездок, а также в медицинских учреждениях разного уровня. Однако большинство используемых сегодня методов выявления инфекционных заболеваний являются дорогостоящими, требуют наличия специализированного оборудования, высококвалифицированных кадров и требуют длительного времени для выполнения.

Среди перспективных новых методик, позволяющих детектировать инфекционный агент в образце, особого внимания благодаря их высокой чувствительности заслуживают методики, основанные на использовании систем CRISPR-Cas. Недавно описаны методы, основанные на использовании Cas-нуклеаз и позволяющие детектировать крайне малые количества нуклеиновых кислот в образце. В основе метода лежит явление коллатеральной активности, присутствующее у некоторых Cas-нуклеаз. Суть явления состоит в узнавании целевой мишени, переходу конформации Cas-белков в активное состояние, приводящее к цепному неспецифическому разрезанию множества нецелевых молекул РНК/ДНК, которое может быть детектировано флуоресцентными методами (например, используя диссоциацию флуорофора и гасителя при расщеплении РНК или ДНК зондов эффекторным комплексом). Этот подход позволяет получить чрезвычайно высокую чувствительность метода, так как сформировавшийся эффекторный комплекс способен расщепить множество молекул ДНК или РНК.

Данная работа посвящена созданию универсальной диагностической платформы, позволяющей быстро, точно и без использования сложного оборудования выявлять патогены в образце. Разрабатываемая система нацелена на точное экспресс-выявление вируса SARS-CoV-2 и его вариантов. В основе диагностической платформы лежит использование нуклеазы Cas12a в сочетании с изотермической амплификацией генетического материала и детектирование разрезания ДНК-зондов флуоресцентными методами.

В рамках работы были созданы генетические конструкции, позволяющие эффективно выделять все белковые компоненты рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА), а также нуклеазу Cas12a. Разработаны протоколы проведения изотермической амплификации генетического материала вируса SARS-CoV-2, получены протоколы проведения CRISPR-реакции, а также разработан метод детектирования флуоресцентного сигнала, возникающего при наличии ДНК патогена в образце.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках программы «Приоритет 2030» (Соглашение 075-15-2021-1333 от 30.09.2021).

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ,
ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2017-2021 гг. ПО ДАННЫМ
ФРАГМЕНТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ S ГЕНА**

*Мусаева Т.Д.¹, Фадеев А.В.¹, Писарева М.М.¹, Едер В.¹, Ксенафонтов А.Д.¹,
Киселева И.В.^{1,2}, Комиссаров А.Б.¹*

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

²ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

На сегодняшний день известны четыре сезонных коронавируса человека (HCoV), которые являются эндемичными во всем мире (229E, NL63, OC43 и HKU1). Геном коронавирусов представлен однонитевой линейной молекулой РНК положительной полярности размером 27–32 тыс. нуклеотидов. В результате рекомбинации РНК коронавирусов разных видов могут появляться новые варианты, приобретающие нехарактерный тканевый тропизм, более высокую вирулентность и способность преодолевать межвидовой барьер.

В настоящее время, история возникновения и эпидемиология сезонных коронавирусов человека имеет огромное значение для контроля и лечения вновь возникающих новых коронавирусов. В Санкт-Петербурге заболеваемость, вызванная сезонными коронавирусами, в разные годы составляет от 0,7-5%. В городе ведется постоянный мониторинг за сезонными коронавирусами, однако глубокий генетический анализ не проводится. В связи с этим, целью данного исследования явился анализ генетического разнообразия сезонных коронавирусов человека, циркулировавших на территории Санкт-Петербурга.

Для скрининга использовали назофарингиальные мазки и мазки из зева от пациентов медицинских учреждений г. Санкт-Петербурга. РНК HCoV выявляли с помощью наборов реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скринFL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзор) на приборах для ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для определения видовой принадлежности изолятов использовались праймеры и зонды CDC (Атланта, США). В анализ были взяты 51 образец из эпидемических сезонов 2017-2021 гг. Исследование генетического разнообразия осуществляли методом Сенгера с помощью генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer с использованием праймеров, комплиментарных рецептор-связывающему участку S-гена.

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-229E использовался алгоритм MAFFT. Построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (ML, GTR+G) проводили в программе Ugene v45. Визуализировали деревья с помощью FigTree v1.4.3.

В результате анализа аминокислотных последовательностей, у вирусов HCoV-229E были обнаружены характерные для образцов из Санкт-Петербурга замены: N213D, V288E, N/D307K, R/Q311G, S407L. Филогенетический анализ фрагмента S-гена вирусов HCoV-229E, циркулировавших в Санкт-Петербурге в 2018-2019 гг. и вирусов, выгруженных из GeneBank, показал наиболее близкое родство с вирусами, циркулирующим в Японии, США и

Швейцарии.

В анализируемом фрагменте S-гена HCoV-OC43 аминокислотных замен не обнаружено. Вирусы входят в один клайд и наиболее близки к вирусам, циркулирующим в Японии (Yohei Matoba et al, 2018), а также к вирусу энцефаломиелита свиней (E. Vieler et al, 1995).

Анализ аминокислотных последовательностей HCoV-NL63 не выявил замен, общих для образцов из Санкт-Петербурга, но были обнаружены замены, характерные для единичных последовательностей: T381A, Y437N, 446P, M466T, I607S, T/A608D, F620N. HCoV-NL63, циркулировавшие в Санкт-Петербурге, были филогенетически родственны китайским, японским и американским вирусам и в некоторых случаях образовывали самостоятельные клаиды.

Исследованные образцы HCoV-NKU1 принадлежали генотипу А (преимущественно) и В и были родственны японским и китайским изолятам. Аминокислотные замены были обнаружены в одном образце (16391 21/22): N613K, S622Y, W624L, 630Y, 641D, G721D, Ins591L.

Таким образом, была проведена оценка генетического разнообразия HCoVs, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Были обнаружены замены, характерные только для изолятов Санкт-Петербургских HCoV-229E и HCoV-NL63, в пределах анализируемой выборки. Вирусы HCoV-NKU1 имели генотип А, В, что соответствует мировой тенденции, а HCoV-OC43 показали высокую консервативность в рецептор-связывающем участке S-белка.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОГО Т-ХЕЛПЕРНОГО ПЕПТИДА PADRE ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Ожерельева О.О., Шуклина М.А., Видяева И.Г., Степанова Л.А.

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

Актуальность. Одной из платформ для разработки гриппозных вакцин широкого спектра действия являются рекомбинантные белки, несущие консервативные антигены вирусов гриппа А. В качестве консервативных эпитопов используют участки белков HA, NA, NP, M2, M1. В данной работе исследовались рекомбинантные белки на основе SAP (SAP - self-assembling peptide), который способен к самосборке *in vitro* в сферические частицы размером 30-50 нм и представлению антигенов на поверхности этих частиц. Для усиления иммунного ответа в одну из конструкций был встроен универсальный Т-хелперный пептид 'PADRE' (pan HLA DR-binding epitope – AKFVAAWTLKAAA).

Цель работы: исследование иммуногенных и протективных свойств рекомбинантных белков на основе SAP с включением пептида PADRE.

Материалы и методы: Рекомбинантные белки были получены в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, руководитель работ Н.В. Равин. Конструкция PADRE(-) :19S_NP335_NP255_SAP_Sp_2(GS_HA2)_4M2eh несет эпитопы NP, фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы и 4 копии M2e. Конструкция PADRE(+): 19S_Padre_NP335_NP255_SAP_Sp_2(GS_HA2)_4M2eh, дополнительно включает пептид PADRE. Исследование иммуногенности проводилось на самках мышей линии Balb/c. Мышей иммунизировали трехкратно подкожно в дозе 40 мкг/мышь (объем вводимого препарата 150 мкл) с интервалом в 2 недели. Для определения уровня специфических антител через две недели после третьей иммунизации у мышей проводили забор крови и бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ). Титры IgG определяли к пептиду M2e и вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в иммуноферментном анализе (ИФА). Для определения протективных свойств белков через две недели после 3-й иммунизации мышей заражали вирусом гриппа A/Aichi/2/68 H3N2 в дозе 4LD50. Достоверность статистических различий оценивали в GraphPad Prism 9.5.1 (дисперсионный анализ, тест Тьюки, тест Mantel-Cox для данных выживаемости).

Результаты. Подкожное введение мышам обеих конструкций стимулировало выработку анти-M2e IgG в сыворотке крови и БАЛ. В то же время иммунизация PADRE(+) индуцировала достоверный прирост анти-H3N2 IgG в сыворотках мышей по сравнению с PADRE(-) (Рисунок 1). Максимальная потеря веса у мышей опытных и контрольной группы составляла: в группе PADRE (-) – 10 %; в группе PADRE (+) – 8 %; и в контрольной группе – 18 %. Иммунизация конструкциями PADRE(+) и PADRE(-) приводила к уровню защиты 100 и 90% соответственно.

Заключение. Трехкратная иммунизация мышей индуцировала высокие уровни анти-M2e IgG в сыворотках и БАЛ при иммунизации обеими конструкциями. Дополнительный эпитоп PADRE усилил формирование антительного ответа к вирусу гриппа A/H3N2, а также снижал потерю массы тела мышей при заражении. Обе конструкции показали выраженные защитные свойства при заражении гомологичным вирусом. Для определения эффективности включения пептида PADRE необходимо провести исследование специфического Т-клеточного ответа на антигены, входящие в состав конструкций.

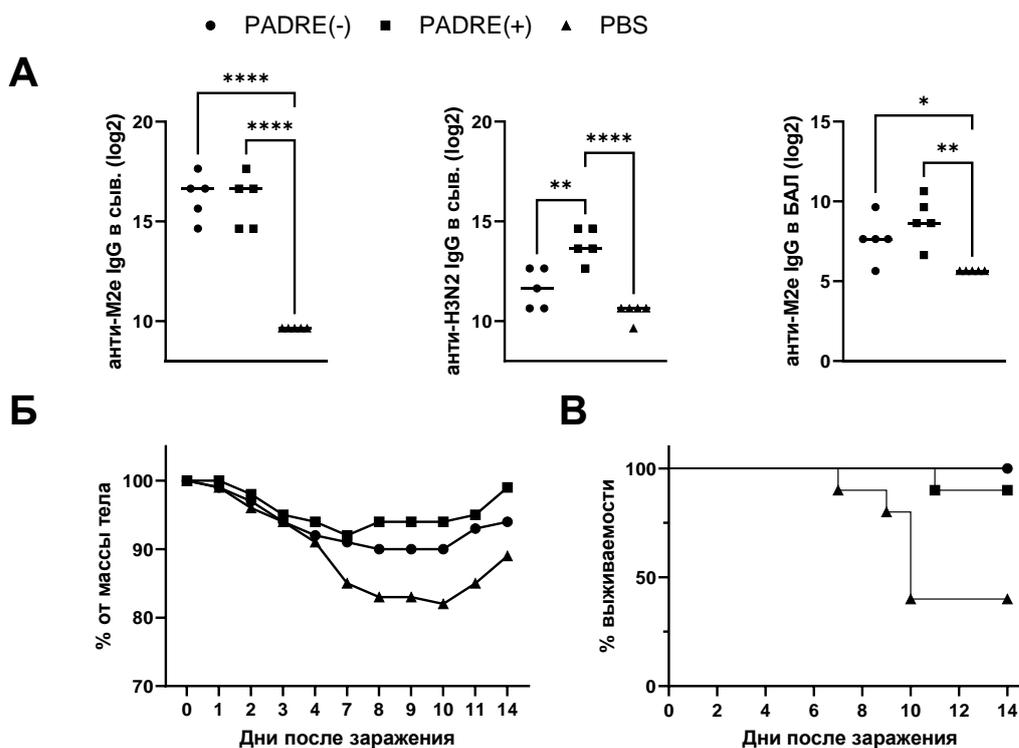


Рисунок 1. Титры (log₂) специфических антител к M2e и к A/H3N2 в сыворотках и БАЛ поле 3-й иммунизации (А). Динамика массы тела (Б) и гибели (В) мышей после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 4LD₅₀.

*- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; ****- $p < 0,0001$

ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЙ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ ПРИ ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ И РИНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ С ПОРАЖЕНИЕМ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Орлова Е.Д.¹, Даниленко Д.М.², Тянь Н.С.¹, Бабаченко И.В.^{1,3}

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

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

³*Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия*

Современные исследования демонстрируют изменение этиологии инфекции нижних дыхательных путей (НДП) с бактериальной на вирусную, что также связано с распространением ПЦР-диагностики. Доминирующую роль в структуре поражения НДП у детей занимают РС-вирусная и риновирусная инфекции. Для повышения эффективности ПЦР-диагностики может быть применена оценка значений порогового цикла (Ct), которые обратно пропорциональны количеству нуклеиновых кислот вируса в образце.

Цель: оценить взаимосвязь уровня Ct с характером течения и тяжестью поражения НДП при РС-вирусной и риновирусной инфекции у госпитализированных детей.

Материалы и методы: проведено проспективное исследование 72 детей с инфекцией НДП, находившихся на госпитализации в клинике ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России. Всем детям проводилось исследование назофарингеальных мазков на респираторные вирусы методом ПЦР с определением значения Ct.

Результаты: РС-вирус был обнаружен в назофарингеальных мазках у 28 пациентов (38,9%), риновирус – у 18 (25%), другие респираторные вирусы были выявлены в небольшом количестве случаев. В возрастной структуре больных РС-вирусной инфекцией доминировали дети грудного возраста – 42,9% (n=12); доля детей в возрасте 1 года составила 17,9% (n=5), 2 лет – 25% (n=7), дети старше 2 лет госпитализировались значительно реже – в 14,3% случаев (n=4). Риновирусная инфекция была характерна для детей в возрасте 2 лет и старше – 38,9% (n=7) и 33,3% (n=6) соответственно, доля детей грудного возраста составила 11,1% (n=2), 1 года – 16,6% (n=3). При этом показатели Ct не зависели от возраста детей в обеих этиологических группах ($r=0,17$; $r=0,23$; $p>0,05$). Тяжелое течение заболевания переносили 21,5% (n=6) детей с РС-вирусной и 33,3% (n=6) детей с риновирусной инфекциями. Значения Ct были достоверно ниже при РС-вирусной инфекции тяжелой степени ($18,5\pm 6,4$), чем у детей, переносящих заболевание средней степени тяжести ($22,9\pm 5,4$), $p=0,001$. Аналогичной закономерности для риновирусной инфекции не наблюдалось ($p>0,05$). Пневмония была диагностирована у 14,3% (n=4) детей с РС-вирусной инфекцией, наблюдались достоверные различия в значениях Ct при пневмонии ($17,7\pm 3,0$) и бронхите ($22,6\pm 3,5$), $p=0,016$. У пациентов с риновирусной инфекцией диагноз пневмонии был поставлен в 33% (n=6) случаев, достоверных различий уровней Ct между пациентами с пневмонией ($24,6\pm 4,4$) и бронхитом ($22,8\pm 3,5$) не выявлено. Заболевание осложнялось развитием дыхательной

недостаточности (ДН) у 60,7% (n=17) детей с РС-вирусной инфекцией, причем значения S_t у этой группы пациентов были достоверно ниже, чем у детей без развития ДН ($p=0,011$): $20,9 \pm 3,9$ против $23,5 \pm 3,2$ соответственно. Выявлена умеренная положительная корреляция между значением S_t и минимальным уровнем сатурации крови у детей с РС-вирусной инфекцией ($r=0,44$, $p<0,05$). При риновирусной инфекции ДН отмечалась в 44,4% (n=8) случаев, и хотя значения S_t у пациентов с данным осложнением были ниже ($22,1 \pm 4,4$), чем без него ($24,9 \pm 2,5$), достоверных различий не отмечено. Корреляционный анализ не выявил взаимосвязей между значениями S_t и длительностью заболевания, госпитализации, продолжительностью кашля и ринореи у пациентов в обеих этиологических группах. Отмечена умеренная отрицательная корреляция между S_t и длительностью аускультативных изменений в легких при риновирусной инфекции ($r=-0,46$, $p<0,05$). При анализе лабораторных показателей не выявлено корреляции между значениями S_t и выраженностью воспалительных изменений в гемограмме. Однако, отмечается значимая обратная взаимосвязь между значениями S_t и С-реактивного белка при РС-вирусной инфекции ($r=-0,6$, $p<0,05$).

Выводы: При РС-вирусной инфекции значения S_t были достоверно ниже у детей с тяжелым течением заболевания, пневмонией, дыхательной недостаточностью. При риновирусной инфекции статистически значимых различий в зависимости от клинической формы не выявлено. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения выявленных закономерностей.

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЭНТЕРОВИРУСА D68

*Передерий А.А.¹, Айвазьян И.С.¹, Полякова В.², Лунарев А.², Фадеев А.В.¹,
Ксенафонтов А.Д.¹, Коржанова М.¹, Даниленко Д.М.¹, Комиссаров А.Б.¹, Лиознов Д.А.¹*

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

²ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

Энтеровирус D68 (EV-D68) представляет собой высококонтагиозный респираторный вирус, поражающий преимущественно детей и способный вызывать тяжелые респираторные заболевания, приводящие к госпитализации и в некоторых редких случаях к летальному исходу. Это сделало EV-D68 предметом серьезной озабоченности для министерств здравоохранения различных стран. Впервые вирус появился в 1960-х годах, но оставался редким до 2014 года, когда в США была зарегистрирована общенациональная эпидемия. С тех пор вирус продолжает представлять угрозу для здоровья населения, периодически вызывая вспышки в различных странах мира.

С развитием технологий секвенирования следующего поколения (NGS) и широким внедрением этих технологий в генетический надзор за вирусами во время пандемии COVID-19, время и стоимость получения высококачественных геномных данных значительно сократились. Полногеномное секвенирование вирусов является мощным инструментом как исследования эволюции вирусных патогенов, так и контроля за их распространением, позволяя определить происхождение и пути распространения, выявить новые эпидемически значимые варианты, идентифицировать мутации, влияющие на вирулентность, динамику передачи и лекарственную устойчивость вируса. К сожалению, в настоящее время данные о распространении и генетическом разнообразии энтеровируса D68 на территории России отсутствуют. В связи с этим, разработка протокола для полногеномной амплификации и секвенирования EV-D68 является актуальной и важной задачей.

Нами был разработан протокол полногеномного секвенирования EV-D68. Дизайн праймерной панели для полногеномной амплификации (WGA) проводили с помощью веб-инструмента PrimalScheme. Было подобрано пять пар праймеров, ожидаемая длина ампликонов составила около 1600 п.о. Валидацию праймерной панели проводили на клинических материалах от госпитализированных пациентов с подтвержденной энтеровирусной инфекцией, предоставленных ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Секвенирование генома проводилось при помощи MGI DNBSEQ-G400. В результате исследования был отсеквенирован первый геном EV-D68 из России (EV-D68/Russia/MOW-RIP-MH124611/2022). Длина отсеквенированного генома составила 7,367 нуклеотидов, с покрытием 10,000x. Отсеквенированный геном был проаннотирован и депонирован в базу данных GenBank (код доступа OQ553811). Разработанный протокол может быть использован при построении системы генетического надзора за энтеровирусом D68 в Российской Федерации.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К F-БЕЛКУ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

*Петрова Е.Р., Кривицкая В.З., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Сверлова М.В.,
Комиссарова К.С., Соминина А.А., Даниленко Д.М.*

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

Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) человека представляет серьезную проблему для мирового здравоохранения, являясь наиболее частой причиной серьезных респираторных заболеваний детей раннего возраста (около 60 000 летальных случаев в год среди детей в возрасте до 5). Метаанализ данных о заболеваемости в развитых странах показал, что РСВ-инфекцией обусловлено более 3 миллионов случаев госпитализации в год. РСВ существуют в виде одного серотипа, но двух антигенных групп (субтипов РСВ-А и РСВ-В).

В НИИ гриппа была получена и охарактеризована панель из 16 моноклональных антител (МКА) к РСВ. Вирус-нейтрализующими свойствами обладали 8 МКА- 5F3, 5H8, 5F8, 7B12, 12C9, 9E12, 10G6, 7H8.

Методом Western-блоттинга было показано, что все полученные МКА взаимодействовали с F-белком РСВ. Зрелый F-белок является поверхностным гликопротеином РСВ, имеет пространственно сложно организованную олигомерную структуру. Использование различных режимов проведения данного метода позволило оценить особенности взаимодействия МКА с белком-мишенью. Все МКА, подобно коммерческому препарату паливизумабу (гуманизированные нейтрализующие анти-F МКА), использованному для сравнения, активно взаимодействовали с нативной олигомерной (гомодимерной и гомотримерной) формой F-гликопротеина РСВ с молекулярной массой (ММ) от 140 до 190 кДа. С гомодимерной формой (ММ 135-140 кДа) наиболее активно связывались МКА 9C5, RS25, 5H8, 7H8 и 9H1. С мономерной молекулой F-белка (ММ 65-70 кДа), взаимодействовали только 5 МКА – 9C5, RS25, 11G4, 10G6, 9H1. Из них лишь МКА 10G6 являлись нейтрализующими. С первичной аминокислотной последовательностью F-белка, лишенной пространственной молекулярной организации, МКА, так же как и паливизумаб, не реагировали. Таким образом, все полученные нами МКА показали зависимость от конформационной структуры их эпитопов-мишеней в составе молекулы F-белка. При этом у нейтрализующих МКА это свойство проявлялось более выражено.

Методом конкурентного ИФА была охарактеризована эпитопная направленность полученных МКА. На основании данных о конкуренции МКА друг с другом, а также данных по их нейтрализующей активности была составлена схема вероятной локализации и взаимного расположения сайтов F-белка РСВ, индуцирующих синтез вирус-специфичных антител (Рисунок 1).

В результате было выявлено 7 сайтов взаимодействия МКА с F-белком РСВ. Из них 4 оказались обособленными: 3 нейтрализующих сайта (эпитопы-мишени для МКА 1-7B12/12C9/10G6; 2-5F8; 3-5H8) и один ненейтрализующий эпитоп 1H3. Один сайт,

включающий как нейтрализующие эпитопы (5F3/7H8/9E12), так и ненейтрализующий 12C8, примыкал структурно к ненейтрализующему сайту (7H11/RS25/9C5/4F2). С этим же ненейтрализующим сайтом независимо пересекался другой ненейтрализующий сайт (12C8/11G4/9H1). Возможно, три взаимно пересекающихся сайта, схематически показанных на Рисунке 1, представляют одну антигенную детерминанту со сложной пространственной организацией, включающей в себя как нейтрализующие, так и ненейтрализующие эпитопы.

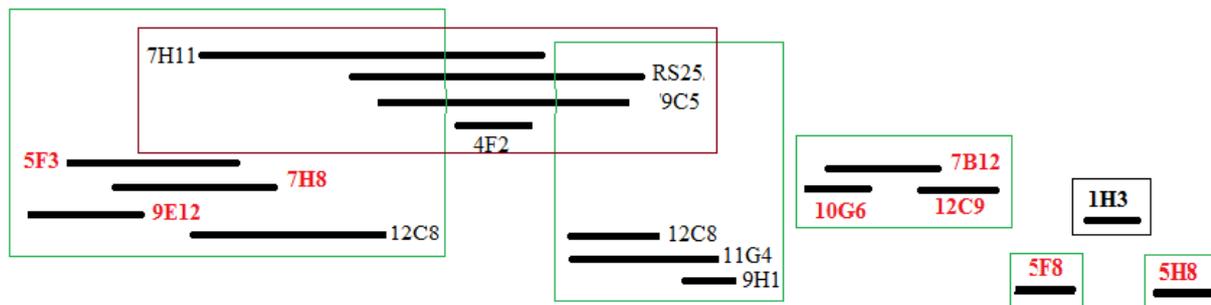


Рисунок 1. Схематическое расположение эпитопов-мишеней полученных МКА в структуре молекулы F-белка РСВ

Следует отметить, что, исходя из результатов конкуренции МКА, эпитоп 12C8 оказался структурно дискретным, пространственно разделенным по двум отдаленным друг от друга последовательностям. Для РСВ дискретность антигенных детерминант не является уникальной. Так, антигенный-сайт F-белка Ø (зеро) включает аминокислотные-последовательности (АКП) различных субъединиц белка: F1 (АКП 196-231) и F2 (АКП 62-69).

Для оценки способности полученных МКА взаимодействовать с современными штаммами РСВ, циркулировавшими в г. Санкт-Петербурге в 2014-2022 гг., было проанализировано 73 изолята РСВ-А и 22 изолята РСВ-В. Для ряда МКА была показана типоспецифичность. МКА 5F3 и 1H3 достоверно чаще выявляли РСВ-А, а МКА 7B12, 10G6, 12C9 и 5F8 – РСВ-В. Наиболее эффективно с обоими субтипами РСВ взаимодействовали МКА 12C8, 7H11, RS25, 4F2, 11G4, 9H1. Данные МКА направлены к консервативным эпитопам и могут быть использованы для выявления РСВ в различных диагностических тестах.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Шелепанова Т.Н., Васильева А.Д., Коновалова Н.И.

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

По сравнению с другими подтипами вирусов гриппа, вирусы гриппа А(Н3N2) характеризуются более высокой скоростью эволюции и как следствие более частой сменой антигенного варианта. Однако по сравнению с предыдущим сезоном (2021-2022 гг.), когда вирусы гриппа А(Н3N2) составляли более 90% от всех выделенных штаммов, в данный сезон отмечались лишь спорадические случаи заболеваний, вызванные этим возбудителем. В текущий эпидемический сезон вирусы гриппа А(Н3N2) были выделены в трех городах - в Санкт-Петербурге, Хабаровске и Астрахани.

Вирусы гриппа А(Н3N2) антигенно охарактеризованы двумя методами: РТГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата с 0,75% эритроцитами морской свинки и РН (с детекцией cell-ELISA). Большинство тестируемых изолятов взаимодействовали с хорьковой антисывороткой к вакцинному штамму А/Дарвин/06/21 и А/Дарвин/9/21 до 1-1/4 гомологичного титра. С антисывороткой к вакцинному вирусу 2021-2022 гг. А/Камбоджа/e0826360/20 исследуемые изоляты реагировали до 1/8-1/16 гомологичного титра, что свидетельствует об продолжающемся антигенном дрейфе. Также схожий уровень взаимодействия отмечен и для крысиной антисыворотки к референс штамму А/Санкт-Петербург/RII-01/21. С данной антисывороткой современные вирусы взаимодействовали до 1/4-1/8 гомологичного титра.

На антигенной карте (Рисунок 1) продемонстрировано, что вирусы 2022-2023 гг. выделения (выделены оранжевым цветом) находятся на значительной антигенной дистанции от референс-вирусов А/Сингапур/INFIMH-16-0019/16 и А/Канзас/14/17. При этом современные вирусы находятся в пределах 1-2 квадратов карты от кандидатов в вакцинные штаммы сезона 2022-2023 и 2023-2024 гг. для Северного Полушария А/Дарвин/06/21 и А/Дарвин/09/21.

Таким образом, антигенный анализ показал общее соответствие, выделенных в России вирусов гриппа А(Н3N2) вирусам-кандидатам в противогриппозные вакцины на 2022-2023 гг.

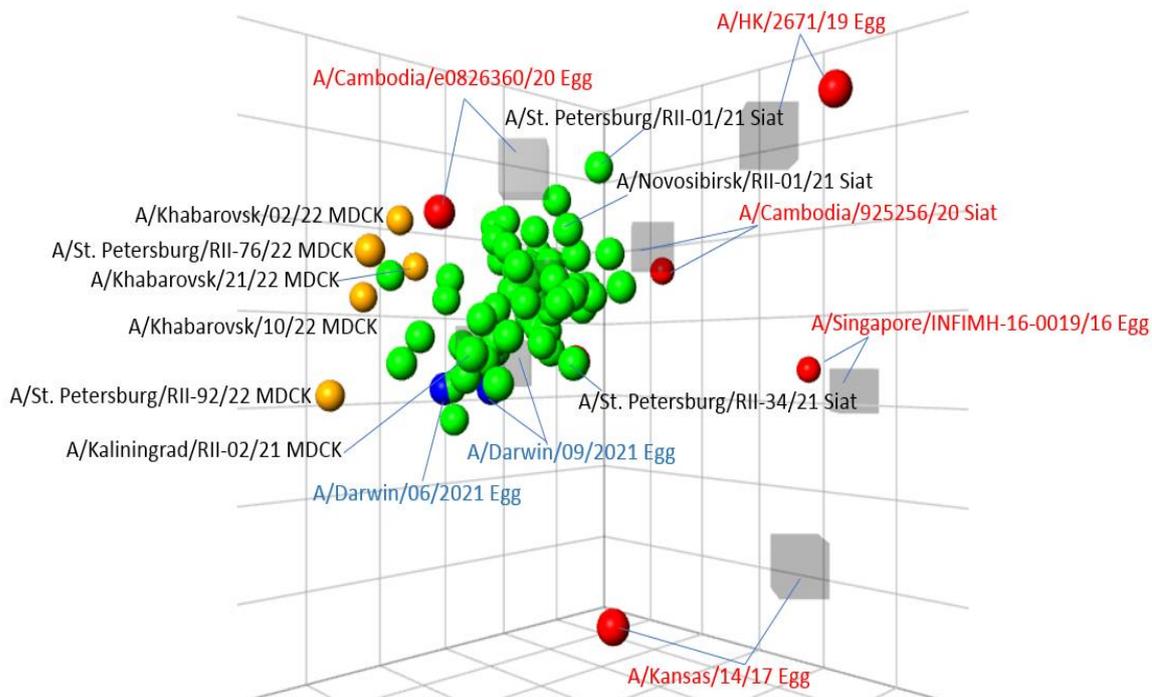


Рисунок 1. Трехмерная антигенная карта вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных в России в начале эпидемического сезона 2022-2023 гг.

Красные кружки – референс штаммы; синие кружки – вакцинные штаммы, рекомендованные ВОЗ на эпидемический сезон 2022-2023 гг. для Северного полушария; оранжевые кружки – российские изоляты текущего сезона; зеленые кружки – российские изоляты предыдущего сезона; серые квадраты – постинфекционные поликлональные хорьковые антисыворотки.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)*pdm09*, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2022-2023 гг.

*Петрова П.А., Бояринцева А.Ю., Шелепанова Т.Н., Васильева А.Д.,
Желтухина А.И., Коновалова Н.И.*

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

Вирусы гриппа А(Н1N1) часто эволюционируют по так называемому «молчащему пути», когда аккумуляция мутаций в гене НА приводит к появлению вируса с антигенными свойствами и геномным набором оптимальным для эпидемического распространения. В последние годы наблюдается увеличение скорости антигенного дрейфа у данного подтипа, что косвенно демонстрирует смена вакцинных штаммов: A/Brisbane/02/2018→ A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019→ A/Victoria/2570/2019→ A/Victoria/4897/2022. Кроме того, возможна циркуляция нескольких антигенных и генетических вариантов А(Н1N1)*pdm09* в течение одного эпидемического сезона.

Нами определена структура популяции вирусов гриппа, циркулирующих на территории России в эпидемическом сезоне 2022-2023 гг. Вирусы гриппа А(Н1N1)*pdm09* являлись доминирующим возбудителем, удельный вес которых, по данным вирусовыделения, составил 76,3%.

Для изучения антигенных свойств современных изолятов нами были проанализированы 375 вирусов А(Н1N1)*pdm09* в РТГА. Все вирусы этого подтипа были антигенно схожи с вакцинным штаммом 2022-2023 г. A/Victoria/2570/2019. С хорьковой поликлональной антисывороткой к этому вирусу исследуемые изоляты взаимодействовали до 1-1/4 гомологичного титра. С антисыворотками к референс-вирусам A/Denmark/3280/2019 и A/Wisconsin/588/19 современные эпидемические штаммы взаимодействовали до 1-1/2 гомологичного титра. Данные эталонные штаммы принадлежат к генетической группе 6В.1А.5а.2 и отличаются характерными аминокислотными заменами в НА, такими как K130N, N156K (антигенный сайт Sb), L161I, V250A, E506D.

По результатам генетического анализа установлено, что все циркулирующие вирусы относятся к генетическому клайду 6В.1А.5а.2. При этом можно выделить группу вирусов, имеющие замены P137S, K142R, D260E, T277A, E356D, N451H, которые присутствуют у нового вакцинного штамма для Северного полушария на эпидемический сезон 2023-2024 гг. A/Victoria/4897/2022 (генетическая группа 6В.1А.5а.2а.1). Установлено, что по своим антигенным свойствам вирусы, обладающие этими заменами существенно не отличаются от большинства циркулирующих штаммов А(Н1N1)*pdm09*.

Также был проведен сравнительный антигенный анализ современных изолятов с представителем генетического клайда 6В.1А1 (референс-штамм A/Brisbane/02/2018) и 6В.1А.5а.1 (референс-штамм A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019). Все выделенные в 2022 – 2023 гг. вирусы А(Н1N1)*pdm09* значительно отличались от эталонов предыдущих лет, что свидетельствует о прогрессирующем антигенном дрейфе.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОВ NS И NP

Прокопенко П.И., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Гошина А.Д., Чистякова А.К.

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Широкий спектр адаптивного иммунного ответа, вызываемого живыми аттенуированными гриппозными вакцинами (ЖГВ), делает эти вирусы перспективной платформой для разработки высокоэффективной вакцины, способной защитить человека от различных генетически удаленных вирусов гриппа. В настоящем исследовании для дальнейшего усовершенствования ЖГВ использовались два подхода, направленных на индукцию более выраженного врожденного и адаптивного иммунного ответа и оптимизацию Т-клеточного ответа на вакцинацию.

Штаммы лицензированной ЖГВ обладают составом генома 6:2, т.е. 6 генов наследуется от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, а 2 гена, кодирующие гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА), происходят от циркулирующего вируса гриппа. Известно, что нуклеопротеин (NP) является основной мишенью Т-клеточного иммунитета против вируса гриппа, и, учитывая, что вакцинный ген NP наследуется от штамма, выделенного в 1957 году, вполне вероятно, что некоторые индуцированные данной вакциной Т-клетки могут больше не распознавать эпитопы циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа. Для решения данной проблемы достаточно включить в состав вакцинного штамма NP ген от эпидемического вируса, т.е. заменить формулу генома 6:2 на 5:3.

Неструктурный белок NS1 вируса гриппа – это многофункциональный белок, участвующий в различных этапах взаимодействия вируса и клетки: он является антагонистом противовирусного клеточного ответа и регулятором экспрессии вирусных и клеточных генов. В частности, белок NS1 вируса гриппа выполняет функцию антагониста интерферона и тем самым способствует развитию продуктивной инфекции, нарушая одно из важнейших звеньев противовирусного иммунитета. Кроме того, С-концу белка NS1 приписывают снижение активации дендритных клеток и, следовательно, уменьшение стимуляции наивных Т-клеток. Также известно, что вирусы, экспрессирующие усеченный белок NS1, способны вызывать высокий уровень адаптивного иммунного ответа, одновременно делая вирус более аттенуированным.

В настоящем исследовании мы объединили эти два подхода для улучшения перекрестного защитного потенциала ЖГВ и сконструировали рекомбинантные вакцинные штаммы с формулами генома 6:2 и 5:3, экспрессирующие полноразмерные или усеченные белки NS1 (Рисунок 1). В работе оценивались репликативные свойства сконструированных штаммов, их иммуногенный потенциал, а также способность защищать экспериментальных животных от заражения летальным гетерологичным вирусом гриппа А.

Было показано, что модификация штаммов ЖГВ путем усечения открытой рамки считывания белка NS1 и встраивания в геном гена NP от современного вируса гриппа не оказывает негативного влияния на репликативные свойства вируса *in vitro*. Кроме того, при

усечении белка NS1 наблюдалось снижение активности вирусной репликации в дыхательных путях мышей, что указывает на более аттенуированный фенотип этих вирусов по сравнению со штаммами ЖГВ с полноразмерным NS1. Это может свидетельствовать о повышенной безопасности NS1-модифицированных вакцин и возможности их использования у детей младше трех лет. Что особенно важно, вакцинный кандидат с модифицированными генами NP и NS индуцировал мощный системный и локализованный в легких ответ CD8 Т-клеток памяти, направленный против более поздних вирусов, и лучше защищал иммунизированных мышей от летальной инфекции, вызванной гетерологичным вирусом гриппа, чем контрольный вариант ЖГВ. Таким образом, эти данные показывают, что ЖГВ с формулой генома 5:3 и усеченным геном NS1 может рассматриваться как перспективная вакцина, обладающая широким спектром действия в отношении различных вирусов гриппа А, и при этом характеризующаяся повышенным уровнем безопасности.

Настоящее доказательное исследование было основано на птичьем подтипе вируса гриппа H7N9; однако ожидается, что аналогичный эффект будет наблюдаться и для циркулирующих в настоящее время сезонных вирусов гриппа подтипов H1N1 и H3N2, чьи последовательности NP также значительно отличаются от донора аттенуации Лен/17.

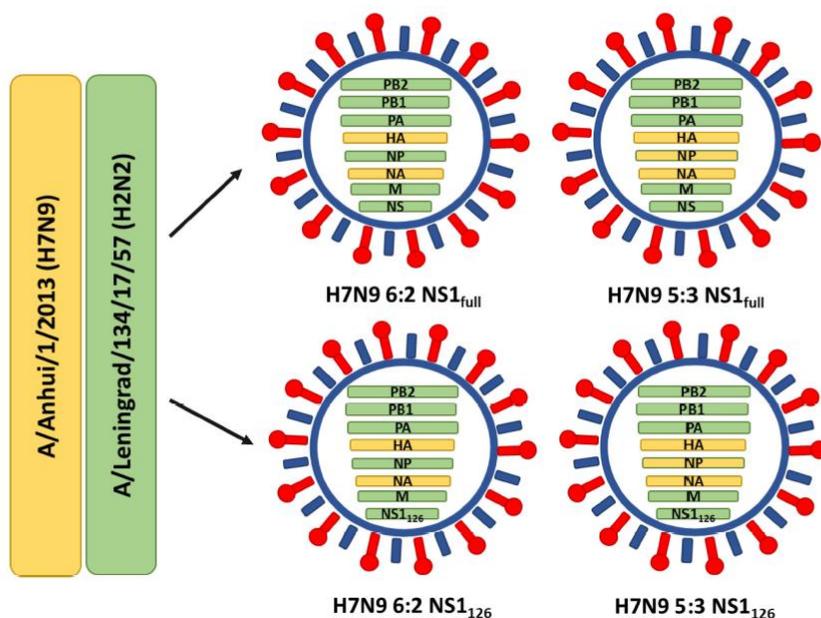


Рисунок 1. Реассортантные вирусы живой гриппозной вакцины, использованные в данном исследовании

ВКЛЮЧЕНИЕ СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА IgG_k УВЕЛИЧИВАЕТ ИММУНОГЕННОСТЬ ВСТАВКИ АНТИГЕНА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В СОСТАВЕ ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА

*Пулькина А.А., Шуклина М.А., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А.,
Шурыгина А.-П.С., Стукова М.А., Егоров А.Ю.*

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

Актуальность: Респираторно-синцициальный вирус (РСВ), наряду с вирусом гриппа и коронавирусом, является одной из основных причин острых инфекций дыхательных путей как среди детей, так и среди пожилых людей. Наиболее эффективным средством профилактики вирусных инфекций является вакцинация, но вакцина против РСВ инфекции до сих пор не зарегистрирована. Перспективным подходом к разработке вакцины является использование аттенуированных рекомбинантных гриппозных векторов, осуществляющих доставку в организм протективных антигенов вируса. При интраназальном введении такая вакцина приводит к формированию мукозального иммунного ответа сразу к двум важным респираторным патогенам.

Цель исследования: оценить влияние включения сигнального пептида IgG_k на иммуногенность вставки антигена респираторно-синцициального вируса в состав рекомбинантного гриппозного вектора с модифицированным белком NS1.

Материалы и методы: Гриппозные векторы были получены методом обратной генетики на основе аттенуированного вируса гриппа A/PR/8/1934 с укороченным белком NS1. Ростовые свойства векторов были проанализированы в перmissive системах (куриные эмбрионы, культурах клеток Vero и MDCK). Экспрессию модифицированного белка NS1 и фрагмента белка F РСВ изучали при помощи метода иммуофлуоресцентного окрашивания. Для изучения протективной эффективности и иммуногенности сконструированных векторов проводили однократную интраназальную иммунизацию мышей линии Balb/c в дозе 6,0 IgТИД₅₀/мышь. На 21 день после иммунизации выявляли тканерезидентные Т-клетки памяти (T_h1), специфичные к антигену РСВ, в ткани легких. Экспериментальное заражение РСВ штаммом А2 проводили интраназально в дозе 6,0 IgБОЕ/мышь. Вирусовыделение РСВ из легких проводили на 4 день после заражения.

Результаты. В рамках исследования были получены два гриппозных вектора NS-2AF и NS-2AsF, экспрессирующих фрагменты белка F РСВ в составе открытой рамки считывания белка NS1. В конструкции NS-2AsF, в отличие от NS-2AF, антиген РСВ был дополнен последовательностью сигнального пептида IgG_k, опосредующего выход трансгена из клетки. Сконструированные векторы были генетически стабильны и обладали высокой репродуктивной активностью (до 8,5 IgЭИД₅₀/мл в РКЭ).

При заражении культуры клеток Vero вирусы демонстрировали различный характер экспрессии антигена РСВ. Инфекция вектором NS-2AF приводила к цитоплазматическому накоплению РСВ-трансгена, тогда как инфекция вектором, содержащим сигнальный пептид IgG_k, сопровождалась лишь слабым РСВ-специфическим сигналом внутри клетки,

что может быть связано с внеклеточной экспрессией трансгена. Наличие сигнального пептида IgGк не влияло на внутриклеточную локализацию белка NS1, он детектировался в цитоплазме зараженных клеток с одинаковой интенсивностью для обоих штаммов.

Однократная интраназальная иммунизация мышей сконструированными векторами способствовала формированию различного уровня CD8+ антиген-специфических Т_{гм}. Вектор NS-2AsF индуцировал более выраженный CD8+ Т клеточный иммунный ответ с преобладанием популяций полифункциональных CD8+ Т_{гм} (Рисунок 1). При экспериментальном заражении в обеих группах мышей отмечали статистически значимое снижение вирусной нагрузки в легких на 2,17 lg БОЕ/мл и 3,15 lg БОЕ/мл, соответственно.

Заключение. Показано, что иммунизация мышей вектором, содержащим IgGк, индуцирует более выраженный CD8+ Т клеточный иммунный ответ с преобладанием популяций полифункциональных CD8+ Т-лимфоцитов. Также иммунизация IgGк-содержащим вектором более эффективно снижает вирусную нагрузку в легких после экспериментального заражения.

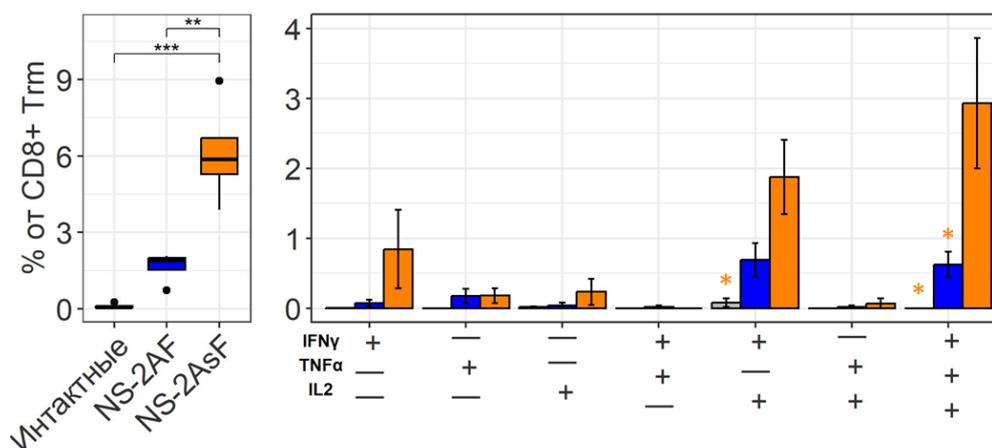


Рисунок 1. Уровень РСВ-специфических CD8 + Т лимфоцитов легких на 21 день после иммунизации (*: p<0.05, **: p<0.01; ***: p<0.001, ****: p<0.0001, ANOVA, критерий Тьюки)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БОРНЕОЛА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА

Разгуляева Д.Н.¹, Штро А.А.¹, Яровая О.И.², Соколова А.С.²

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

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

Вирус простого герпеса первого типа (англ. – *Herpes Simplex Virus 1, HSV1*) занимает второе место в мире по распространению среди вирусных инфекций после гриппа. По последним данным ВОЗ инфицированными являются около 3,7 миллиарда человек, поэтому разработка препаратов, обладающих противовирусным действием является очень актуальной задачей.

В данной работе было проведено исследование противовирусной активности соединений производных борнеола в отношении вируса простого герпеса первого типа. Препараты были впервые синтезированы в лаборатории медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

В ходе исследования библиотеки препаратов были рассчитаны значения ЦТД50 (концентрации препарата, вызывающей гибель 50 % клеток), ЭД50 (концентрация вещества, обеспечивающая выживаемость 50% клеток), на основании которых каждому препарату был присвоен соответствующий ХТИ (химиотерапевтический индекс, отношение ЦТД50 к ЭД50). Эффективными считались препараты с ХТИ выше 10.

Среди 53 протестированных препаратов выраженной противовирусной активностью против вируса простого герпеса первого типа обладает соединение К-81 (AS-364-4-6). В основе этого соединения лежит молекула борнеола, объединенная эфирной связью с карбоновой кислотой пиперидина. Химиотерапевтический индекс данного препарата в отношении вируса простого герпеса первого типа - 16. Другие соединения выраженной противовирусной активностью не обладают.

Таким образом, соединение К-81 обладает противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса первого типа. Планируется провести дальнейшую модификацию химической структуры для усиления противовирусных свойств соединения.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НУКЛЕОКАПСИДА SARS-CoV-2 И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

*Рак А.Я., Забродская Я.А., Горбунов Н.П., Поляков Д.С.,
Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Белок нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 является одним из наиболее консервативных коронавирусных антигенов, подходящим для создания универсальных диагностических тест-систем, необходимых для эффективного контроля за распространением инфекции COVID-19 в условиях постоянного появления новых штаммов патогена. Путем амплификации соответствующих полноразмерных генов и их лигирования в экспрессионный вектор рETDuet-1 были получены бактериальные продуценты рекомбинантных N белков SARS-CoV-2 различных генетических линий. Была проведена оптимизация условий индукции белкового синтеза изопропил-β-D-тиогалактозидом и хроматографической очистки коронавирусных антигенов, которые затем были идентифицированы масс-спектрометрическим и серологическим методами. В дальнейшем на их основе была разработана универсальная тест-система для детекции N-специфических антител в сыворотке крови лиц, перенесших COVID-19, проанализирована кросс-реактивность анти-N антител реконвалесцентов, выработанных в ответ на инфекцию различными вариантами SARS-CoV-2, и продемонстрирован медленный характер эволюции антигенных свойств N-белка SARS-CoV-2. Полученные рекомбинантные антигены также были использованы для иммунизации мышей линии BALB/c с целью изучения влияния появляющихся в них в ходе эволюции вируса адаптивных («escape») мутаций на изменение антигенных и иммуногенных свойств белка нуклеокапсида. Мы показали, что антитела, которые формировались в ответ на введение N белка (B.1), распознавали гетерологичные антигены в меньшей степени, что свидетельствует о накоплении адаптивных мутаций в N белке в процессе эволюции вируса. Аналогично, антитела, индуцированные N (B.1.351), с меньшей активностью распознавались N белками более поздних вариантов SARS-CoV-2. В целом, интенсивность связывания антител с гетерологичными N белками была снижена по сравнению с гомологичным антигеном, что свидетельствует о том, что различия в специфичности анти-N антител, продуцируемых в ответ на иммунизацию сходными антигенами, могут быть обусловлены эволюционно детерминированной вариабельностью иммуногенных эпитопов, приводящей к возникновению «escape» мутаций.

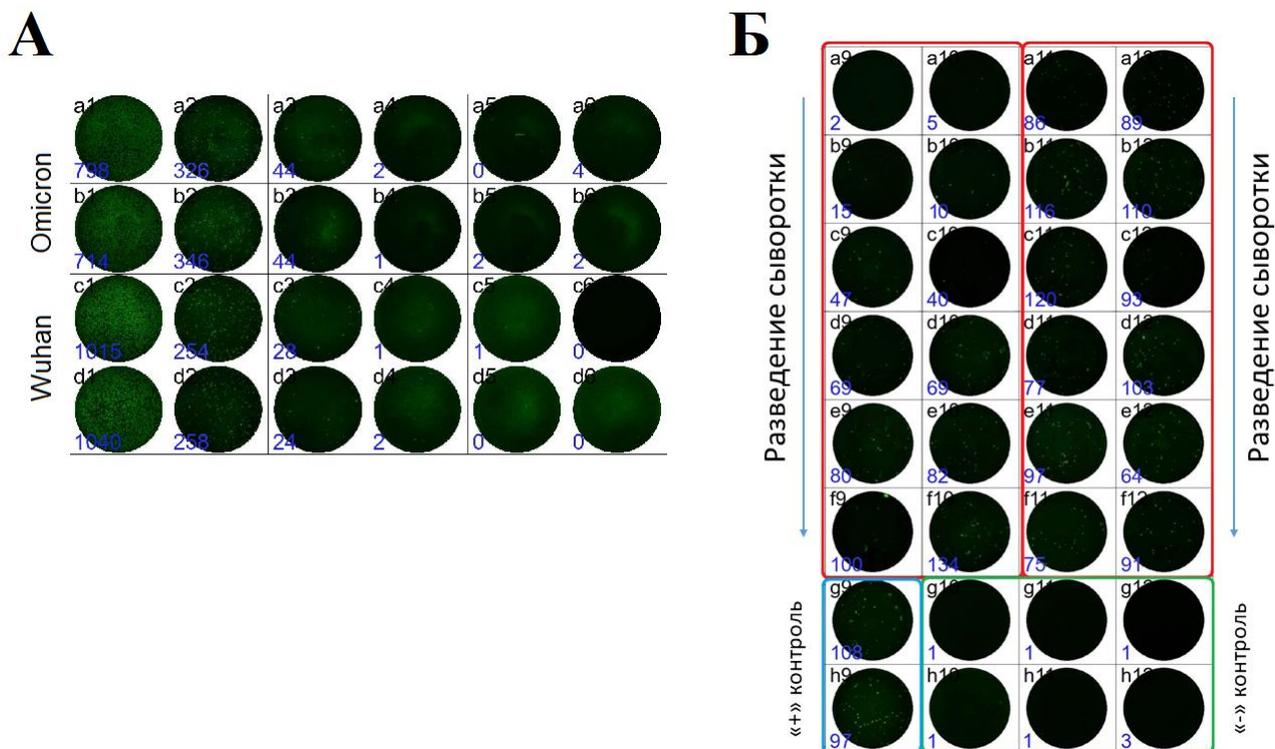


Рисунок 1. Детекция SARS-CoV-2 штаммов B.1 (Wuhan) и B.1.1.529 (Omicron) с помощью тест-системы, разработанной на основе биотинилированных анти-N антител NCL5 в зараженных клетках линии Vero E6: А – через 12 ч (Wuhan) и 20 ч (Omicron) после заражения; Б – при определении титра нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 штамма B.1.1.529

Рекомбинантный N белок варианта B.1 также был использован для получения моноклональных антител, способных к универсальному распознаванию нуклеокапсидных антигенов других штаммов коронавируса. На их основе была разработана уникальная двухкомпонентная иммунофлуоресцентная тест-система для детекции SARS-CoV-2 в зараженных клетках линий Vero CCL81 и Vero E6. Она подразумевает детекцию коронавируса методом focus-forming unit (FFU) и включает в себя биотинилированные мышинные моноклональные антитела против рекомбинантного N белка SARS-CoV-2 (B.1) и рекомбинантный фьюжн-белок стрептавидин-GFP, конъюгированный с флуоресцентной меткой FAM, используемый в качестве проявляющего компонента. Данная система может быть использована при оценке титра нейтрализующих противовирусных антител вне зависимости от штамма коронавируса; пример такого использования приведен на Рисунке 1. Таким образом, рекомбинантные N белки SARS-CoV-2, а также полученные на их основе моноклональные антитела могут быть использованы в качестве основы для создания универсальных тест-систем для диагностики COVID-19.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда №21-75-30003.

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА АДЕНОВИРУСА 5 СЕРОТИПА

Смирнов С.В., Амосова И.В., Шалджян А.А., Шишлянников С.М., Елпаева Е.А., Тимошичева Т.А., Грудинин М.П.

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

Аденовирусы (Ад) являются двухцепочечными ДНК-содержащими вирусами, которые могут вызывать ряд заболеваний человека, большая часть которых приходится на респираторные заболевания. В структуре вириона аденовируса идентифицировано 13 структурных белков, среди которых основными являются гексон, основание пентона и фибрилла, содержащие как группоспецифические, так и типоспецифические антигены. Фибрилла является типоспецифическим антигеном, обладающим гемагглютинирующими свойствами. Структурно белок фибриллы делится на глобулярную структуру, "fiber-knob", которая участвует во взаимодействии с рецепторами на поверхности клетки, и N-концевой участок, связанный с пентоновым основанием вирусного капсида. Антитела к домену "fiber-knob" обладают вируснейтрализующей активностью.

Активное использование Ад векторов в биотехнологии и медицине определяет необходимость изучения уровня антител к Ад в сыворотках крови людей с использованием типоспецифических антигенов, например, таких как глобулярный домен "fiber-knob" белка фибриллы Ад.

Материалы и методы. Для экспрессии фрагмента гена фибриллы, кодирующего домен Adeno5Knob, использовали штамм-продуцент *E. coli* BL21, содержащий рекомбинантную плазмиду pET22b-Adeno5Knob. Индукцию синтеза целевого белка проводили изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Подтверждение экспрессии синтетического белка Adeno5Knob продуцентом подтверждали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Нативность структуры Adeno5Knob подтверждали в ИФА с использованием сывороток крови людей (n=4), положительных на наличие антител к Ад5 в реакции нейтрализации. Сыворотки крови добровольцев были получены в рамках надзора за гриппом и ОРВИ из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Исследование иммуногенности проводили на мышах линии BALB/c (n=2). Животным вводили 40 мкг Adeno5Knob с адъювантом Al(OH)₃ внутрибрюшинно с интервалом в 3 недели. Титр антител определяли в ИФА. Для верификации исследования в ИФА использовали очищенный концентрат Ад5 (оч.Ад5).

Результаты. Определены оптимальные условия получения Adeno5Knob, которые были достигнуты при культивировании бактериальных клеток в 1-литровых колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл культуральной среды (pH 7,4). Экспрессия белка подтверждена методом электрофореза. Согласно результатам анализа, до индукции ИПТГ экспрессия синтетического белка отсутствовала, через 1,5 – 3 часа индукции ИПТГ целевой

белок синтезировался штаммом-продуцентом. Молекулярная масса Adeno5Knob соответствовала 23 кДа.

Очистку белка проводили методом металл-аффинной хроматографии. Для удаления имидазола и примесных солей проводили диализ против буфера ФСБ. В итоге было получено 1,7 мг синтетического белка Adeno5Knob.

Специфическую активность Adeno5Knob исследовали в ИФА: сенсibilизированные Adeno5Knob и оч.Ad5 планшеты, инкубировали с последовательно 2-кратно разведенными сыворотками, начиная с 1:100. Все сыворотки специфически реагировали с оч.Ad5, 3 сыворотки реагировали с Adeno5Knob, титры антител варьировали в пределах 1:3200-1:12800 и 1:400-1:12800, соответственно.

Иммунизация мышей Adeno5Knob стимулировала образование антител на 42 день после начала иммунизации. Наличие специфических антител в сыворотках иммунизированных животных исследовали в ИФА с использованием оч.Ad5 и Adeno5knob в качестве антигенов. Титры антител, специфически взаимодействующих с Adeno5Knob и оч.Ad5, достигали значений 1:800-1:1600.

Заключение. Определены оптимальные условия получения и очистки Adeno5Knob. Белок Adeno5Knob обладает специфической активностью в ИФА и иммуногенностью.

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫХ ДНК-НАНОМАШИН С КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВИРУСОВ

Соляникова В.В.¹, Горбенко Д.А.¹, Рубель М.С.¹, Колпащиков Д.М.^{1,2}, Штро А.А.³

¹НИИ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²Центральный университет Флориды, Орландо, США

³ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Вирусные инфекции относятся к числу распространенных инфекций, вызывающих заболевания у людей любого возраста и пола. Наиболее распространены вирусы-возбудители респираторных инфекций, такие как грипп, парагрипп, риновирус, аденовирус и др. Способность вирусов быстро мутировать и передаваться между хозяевами делает актуальной разработку динамических методов обнаружения. Сейчас, основным методом диагностики остается количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Однако метод требует дорогостоящего оборудования и реагентов, высококвалифицированного персонала. Многообещающие результаты в последнее время дают новые технологии диагностики нуклеиновых кислот, представляющие альтернативу классическим методам ПЦР, например технология SHERLOCK, действие которой основано на CRISPR-Cas13. SHERLOCK объединила изотермическую преамплификацию с Cas13 для обнаружения отдельных молекул РНК или ДНК. Однако данная технология требует использования белковых агентов, чувствительных к температурным условиям хранения. Другой подход - диагностика с применением каталитических ДНК-наномашин позволяет проводить безамплификационную детекцию нуклеиновых кислот в образцах, не требует белкового фермента (в отличие от технологии SHERLOCK) и также обещает быть доступным и удобным инструментом для диагностики как в лабораторных условиях, так и на месте оказания медицинской помощи.

В данной работе были разработаны мультикомпонентные ДНК-наномашин, обладающие каталитической активностью в отношении флуоресцирующего субстрата и способные производить флуоресцентный сигнал в присутствии анализируемых нуклеиновых кислот. Варианты ДНК-наномашин были разработаны для детекции вируса парагриппа человека 3 типа, ВПЧ, и респираторно-синцитиального вируса, РСВ.

Конструкция ДНК-наномашин (Рисунок 1) включает шесть РНК-связывающих плеч (Arm 1-6), которые способны распознавать и раскручивать вторичные структуры РНК (target sequence). Репортерная часть ДНК-машины включает в себя каталитическое ядро дезоксирибозима 10-23 (Catalytic core), обладающее способностью расщеплять одноцепочечные и двухцепочечные нуклеиновые кислоты. Стабилизирует сборку ДНК-наномашин в присутствии всех ее компонентов и детектируемого участка РНК двухцепочечная ДНК-платформа (DNA tile). Также конструкция ДНК-наномашин была улучшена добавлением дополнительной цепи (Hook). Вследствие комплементарности как ДНК-платформе, так и флуоресцирующему субстрату (F-sub), Hook привлекает F-sub из

раствора и повышает его локальную концентрацию вокруг дезоксирибозимного кора, что увеличивает интенсивность детектируемого сигнала.

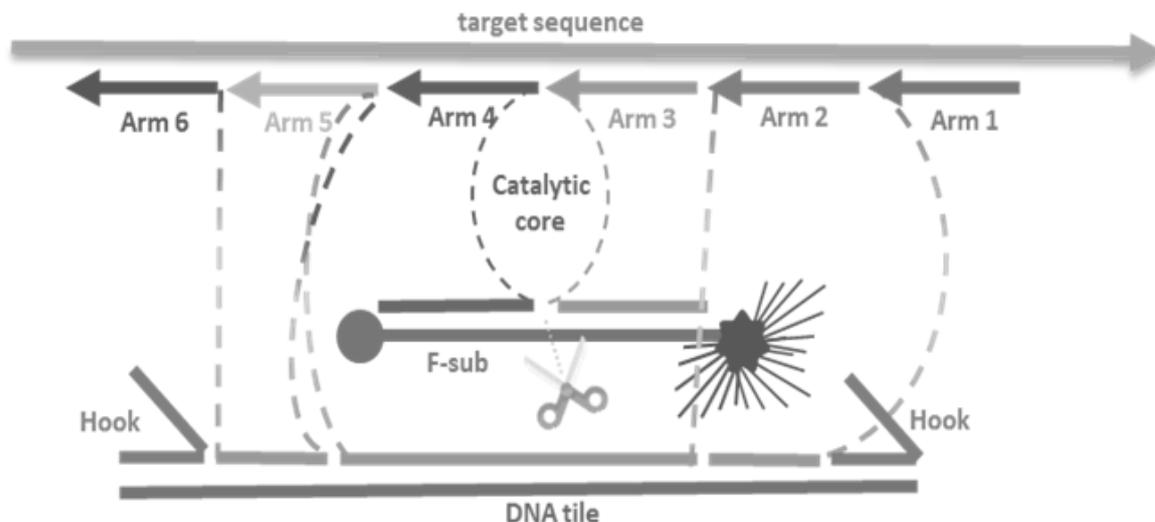


Рисунок 1. Устройство многокомпонентной ДНК-наномшины для детекции РНК: target sequence - анализируемый участок РНК; Arm 1-6 - части ДНК-наномшины; DNA tile - двухцепочечная ДНК-платформа; Hook - последовательность, комплементарная флуоресцирующему субстрату; F-sub - флуоресцирующий субстрат.

Детекцию многокомпонентными ДНК-наномашинами осуществляли *in vitro* с реакционным буфером (200mM MgCl₂, 15mM NaCl, 150mM KCl, 50mM HEPES, pH=7.4), куда также добавляли части ДНК-наномшины (20nM), флуоресцирующий субстрат (200nM), а также синтетический участок детектируемой РНК в разных концентрациях (0pM - 1000pM). Пробы инкубировали при 55°C в течение 1 и 3 часов на водяной бане. Выход флуоресценции из каждой пробирки измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов Spark (480/525 nm).

В результате экспериментов с синтезированным фрагментом РНК вирусов, было показано, что пределы детекции ДНК-наномашин для ВПЧ и РСВ составляют 27 пМ и 36 пМ соответственно. Подобные значения предела детекции являются многообещающими для диагностики РНК-вирусов в реальных клинических образцах с минимальными затратами на оборудование, реактивы и персонал.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА- БАРР И ВИРУСОМ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6, У ДЕТЕЙ

*Тян Н.С.^{1,2}, Бабаченко И.В.^{1,2}, Голева О.В.¹, Орлова Е.Д.¹, Безверхая Н.С.¹,
Кузьмина А.А.¹, Филаева Н.А.¹, Крылов А.В.¹, Эйсмонт Ю.А.¹, Мукомолова А.Л.¹,
Базиян Е.В.¹*

¹Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Герпесвирусные инфекции являются этиологически значимыми патогенами в развитии инфекционного мононуклеоза (ИМ). Доминирующая роль традиционно отводится вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ), однако доказана способность других представителей семейства, в частности вируса герпеса человека-6 (ВГЧ-6), участвовать в развитии данной патологии.

Цель исследования: провести сравнительный анализ клинико-лабораторных особенностей ИМ ВЭБ и ВГЧ-6 этиологии.

Материалы и методы: на базе клиники ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России в период 2021-2022 гг. выполнено проспективное наблюдательное исследование, включившее 40 пациентов с ИМ различной этиологии в возрасте от 2 до 17 лет. Проводились ПЦР-Real-time-анализ цельной крови на выявление ДНК герпесвирусов 4-6 типов, по результатам которого сформированы 2 группы пациентов: 1 – с ВЭБ ИМ (n=33), 2 – с ВГЧ-6 ИМ (n=7); клинический и биохимический анализы крови (определение уровней АЛТ, АСТ, общего билирубина, СРБ). Статистический анализ выполнен с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты: Среди пациентов с ВЭБ ИМ доминировали мальчики (61%), в группе ВГЧ-6 ИМ мальчики и девочки госпитализировались с одинаковой частотой (n=4 и n=3). Дети с ИМ ВГЧ-6 этиологии были достоверно младше ($p < 0,001$; медиана возраста 3 года, Q1-Q3 2-4, против 10 лет, Q1-Q3 5-14). Достоверных различий в сроках заболевания на момент госпитализации выявлено не было: дети поступали в среднем на $7,4 \pm 4,0$ сутки. В группе пациентов с ВЭБ ИМ отмечалась выраженная лихорадка до $38,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$, длительностью $8,3 \pm 3,6$ суток, что было сопоставимо с данными во 2 группе – $39,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$, $6,1 \pm 3,2$ суток. Доминирующими катаральными проявлениями у детей являлись ринит и тонзиллит (в 1 группе – в 85% и 91% соответственно, во 2 – в 100% случаев). Пастозность лица в острый период ИМ отмечалась только в группе пациентов с подтвержденной ВЭБ-инфекцией (n=8; 24%). Осложнения в виде острого среднего отита выявлены у 5 детей с ВЭБ ИМ, у 2 – с ВГЧ-6. Лимфопролиферативный синдром регистрировался у всех пациентов. В группе детей с ВЭБ ИМ преобладала шейная лимфаденопатия значительной степени выраженности (диаметр лимфоузлов до 4,0 см) в 88%

(n=29), шейные лимфоузлы не превышали 1,0 см в 12% (n=4) случаев. Среди пациентов с ВГЧ-6 ИМ данные изменения регистрировались с одинаковой частотой (n=3; 43% и n=4; 56%). Гепатомегалия отмечалась чаще, чем спленомегалия в обеих группах (в 1 группе – n=29; 88% и n=17; 52%; во 2 группе – n=6; 86% и n=2; 29% соответственно).

Достоверных различий в уровне лейкоцитов выявлено не было. В группе ВЭБ ИМ абсолютное и относительное значения лимфоцитов были достоверно выше, чем при ВГЧ-6 ИМ ($p<0,001$). Относительный уровень сегментоядерных нейтрофилов во 2 группе пациентов был достоверно ниже ($p=0,002$). У детей с подтвержденным ВГЧ-6 ИМ атипичных мононуклеаров не обнаружено ни в одном случае. В группе ВЭБ ИМ атипичные мононуклеары отмечались у 88% детей (n=29), из них более 10% – в 58% (n=19). Уровень СРБ в сыворотке крови был достоверно выше у детей с ВЭБ ИМ, чем с ВГЧ-6 ИМ ($p=0,003$). Повышение уровней трансаминаз (АЛТ и АСТ) достоверно чаще выявляли в группе с подтвержденной ВЭБ-инфекцией ($p<0,001$; $p=0,011$). Синдром холестаза (повышение уровня общего билирубина до 28-31 мкмоль/л за счет прямой фракции) был характерен только для 4 пациентов с ВЭБ ИМ (12%) среди всех обследованных детей.

Выводы: В этиологической структуре ВЭБ ИМ сохраняет лидирующие позиции, и по нашим данным регистрировался чаще ВГЧ-6 в 4,7 раза. Клиническая картина сопоставима при разных вариантах ИМ, однако лабораторные изменения более выраженные при ВЭБ-инфекции.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ ГРИППА В/НОРВЕГИЯ/2134/2019 ЯМАГАТСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ

Флорен А.М.¹, Ажойчик Е.В.², Царева Т.Р.², Сорокин Е.В.²

¹*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

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

Вирус гриппа типа В является одним из наиболее значимых возбудителей ОРВИ. В настоящее время в мире циркулируют представители вируса гриппа В обеих современных эволюционных линий – Ямагатской и Викторианской. Это определяет необходимость получения новых моноклональных антител (МКА), направленных как к высоко консервативным эпитопам белков вируса гриппа В, так и к сайтам уникальным для каждой линии.

В НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева были получены 12 гибридом – продуцентов МКА к вирусу гриппа В/Норвегия/2134/2019, принадлежащему к Ямагатской эволюционной линии.

Полученные МКА активно взаимодействовали в ИФА с гомологичным антигеном при отсутствии перекрестных реакций с вирусами гриппа А и вирусами гриппа В Викторианской ветви. Изучение направленности МКА методом иммуноблоттинга позволило установить, что все МКА взаимодействовали с сайтом в составе тяжелой цепи гемагглютинаина (НА1). Все полученные МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью.

Методический прием получения эскейп-мутантов (ЭМ) вирусов в присутствии моноклональных антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, с последующим анализом первичной структуры генома и идентификацией аминокислотных замен, позволяет идентифицировать сайты, ответственные за индукцию вируснейтрализующих антител. Данные исследования важны для понимания структурной композиции гемагглютинаина вируса В, а также путей и направленности его естественной эволюции.

Все 12 разработанных МКА были использованы для получения эскейп – мутантов вируса гриппа В/Норвегия/2134/2019. Для получения ЭМ, данный штамм клонировали в присутствии избытка соответствующих МКА, обладающих выраженной вируснейтрализующей активностью. Смеси вирус-МКА инкубировали в течение часа при 37°C, после чего их вводили в развивающиеся 10-дневные куриные эмбрионы. Через 72 часа аллантоисную жидкость собирали и исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Далее эскейп-мутанты клонировали 3-4 раза методом предельных разведений, после чего исследовали в РТГА с гомологичными и гетерологичными МКА. Анализ эскейп-мутантов в реакции торможения гемагглютинации показал, что полученные МКА направлены к четырем антигенным детерминантам в составе гемагглютинаина:

(I) группа МКА (2A5, 2D8) взаимодействуют с антигенным детерминантам, последовательность которых частично перекрываются с последовательностью антигенных детерминант МКА, относящимися к II и III группам.

(II) группа МКА (3D1, 4D6, 1C10, 4G3, 1D10, 5A11) - очень гетерогенная группа, последовательность антигенных детерминант которых частично перекрывается с последовательностью антигенных детерминант МКА I группы, и, частично МКА III группы.

(III) группа (МКА 1D11, 3F2, 6E9)

(IV) группа содержит МКА 4D11, последовательность антигенных детерминант с которыми взаимодействуют, антитела не имеют перекрестов с последовательностью антигенных детерминант МКА I, II и III групп. МКА 4D11 уникальны, отличаются от МКА всех других групп.

Как известно, гемагглютинин вируса гриппа В включает четыре основные антигенные области – петля-120, петля-150, петля-160, спираль-190 и окружающие их области. Эти структуры расположены в непосредственной близости или частично включены в состав рецептор-связывающего сайта. Эти основные антигенные области расположены близко в пространстве и образуют большой протяженный антигенный сайт. Это подтверждается нашими результатами, когда одно МКА распознает антигенные детерминанты в двух структурно различных, но пространственно близких областях.

Дальнейший анализ секвенированных последовательностей эскейп-мутантов, полученных в лабораторных условиях, позволит оценить антигенную изменчивость гемагглютинина вируса гриппа В на эпителиальном уровне, что может быть важно при отборе эталонных штаммов для включения их в состав современных диагностикумов и вакцин.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Маркович В.А.

НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск, Россия

Актуальность. В настоящее время считается установленным значение вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) в развитии инфекционного мононуклеоза и некоторых пролиферативных заболеваний. Согласно современным литературным данным, возникновение желудочной неоплазии может быть связано также и с персистенцией данного вируса в клетках слизистой оболочки желудка. Основным доказательством этиологической роли ВЭБ в развитии рака желудка служит выявление ДНК вируса исключительно в клетках опухоли, но не в окружающих здоровых клетках. Последнее наблюдение убедительно доказывает, что инфицирование ВЭБ предшествует опухолевой трансформации нормальных клеток желудка. **Целью** данной работы является определение наличия ВПЧ-инфекции в нормальной, опухолевой ткани, канцероматозе и метастазе в лимфотическом узле у больных с диссеминированным раком желудка.

Материалы и методы. В исследование включено 44 пациента с диссеминированным РЖ IV стадий с канцероматозом брюшины. Всем пациентам проведена операция в объеме паллиативной гастрэктомия по Ру. После хирургического вмешательства в зависимости от показаний больным проводилась химиотерапия. Для исследования был использован операционный материал (опухолевая ткань желудка, неизменная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел). Выделение ДНК из всех образцов проведено с помощью наборов QIAamp DNA mini Kit («Qiagen», Germany). Анализ наличия ВЭБ проводился при помощи набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) в клиническом материале («AmpliSens», Россия), с помощью системы «Rotor Gene™ 6000» (Corbett Research, Australia).

Результаты. В результате проведенного исследования ВЭБ был идентифицирован у 31 больного (70% случаев) в опухолевой ткани. У 10% вирус обнаружен в нормальной ткани, у 22 пациентов ВЭБ идентифицировался с канцероматозе и метастазе в лимфотической узле. Важно отметить, что у 12 пациентов вирус был найден во трех тканевых сайтах (кроме нормальной ткани). Интересно, что при анализе с использованием метода Каплана-Майера показатели выживаемости без прогрессирования (ВБП) статистически значимо ниже у таких пациентов (log-rank test $p=0,0001$), медиана выживаемости составляет $9,0\pm 3,2$ месяцев, против $30,0\pm 1,7$ месяцев.

Заключение. Рак желудка, ассоциированный с ВЭБ, является отдельным подтипом опухолей желудочно-кишечного тракта. Полученные данные о наличии ВЭБ не только в опухоли, но и в других тканевых сайтах на одного пациента позволяют предположить, что вирус может не только инициировать процесс онкогенеза в ткани желудка, но и влиять на развитие прогрессирования. Но на данный момент, требуются дальнейшие исследования по идентификации молекулярных характеристик вирус-положительных и отрицательных

пациентов, которые позволят выявить потенциальные терапевтические мишени для персонализированного лечения этой патологии.

МЕТРИКА РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ НУКЛЕОТИДНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ SARS-CoV-2 НА ОСНОВАНИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ МУТАЦИЙ

Чудинов И.К.^{1,2}, Самойлов А.Е.¹, Сперанская А.С.¹

¹ *ФБУН «НИИ системной биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва, Россия*

² *ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия*

Распространение вирусных инфекций влечет необходимость тщательного эпидемиологического контроля за распространением новых генетических вариантов патогенов. Для исследования генетического разнообразия вирусов часто применяются методы филогенетического анализа, позволяющие группировать рассматриваемые последовательности на основании различий нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, однако общим недостатком филогенетического анализа является его длительность (даже при наличии больших вычислительных ресурсов).

В данной работе предлагается методика сравнения геномных последовательностей на основании количественного анализа числа однонуклеотидных мутаций. Для рассмотрения взаимного расстояния на основании однонуклеотидных мутаций вводится метрика дистанции между последовательностями D , представляющая собой мощность симметрической разности множеств мутаций:

$$D = |A / B| + |B / A| = |A| + |B| - 2 \cdot |A \cap B| .$$

Предложенный метод вычисления расстояний был проверен на данных полногеномного секвенирования SARS-CoV-2 из двух географических регионов для проверки возможности разделения последовательностей. Для этого 313 последовательностей (297 из Азии, 16 из России) обработали с помощью Nextclade и получили список мутаций относительно референсного генома (MN908947). Для каждого генома список мутаций был представлен в виде строки, включающей все найденные мутации. Далее применялся метод анализа текста, позволяющий значительно снизить время вычисления предложенной метрики, а именно модуль CountVectorizer, который позволяет рассматривать каждую из мутаций как отдельный токен, что превращает любую строку, содержащую перечисленные мутации, в бинарный вектор, представляющий наличие или отсутствие мутации из упорядоченного списка всех мутаций, встречающихся в выборке последовательностей. Полученная полная выборка последовательностей была представлена бинарной матрицей с количеством строк, равным количеству рассматриваемых последовательностей, и столбцов, равным общему количеству всех уникальных мутаций, обнаруженных в выборке.

Таким образом, задача по вычислению расстояния по метрике дистанций однонуклеотидных мутаций между последовательностями двух рассматриваемых групп A и

В, представляемых бинарными матрицами M_A и M_B , свелась к вычислению матрицы дистанций M_D :

$$M_D = S_A + S_B - 2 \cdot M_A \times M_B^T,$$

где каждый i, j -ый элемент матрицы S_N представляет сумму i -ой строки матрицы N .

Для более корректного сравнения учли ситуацию вхождения в последовательности неопределенных нуклеотидов. Если при сравнении двух последовательностей одна из мутаций, представленная в последовательности a выборки A , попадала на позицию неопределенного нуклеотида (N) в последовательности b выборки B , то такая мутация не учитывалась при подсчете расстояния между последовательностями. Для применения корректирующей добавки предварительно составляли матрицу C , где i, j -ый элемент представлял суммарное количество мутаций j -ой последовательности из B , попадающих на неопределенные нуклеотиды i -ой последовательности из A .

Итоговая матрица дистанций M_D^{res} , представленная разностью первичной матрицы дистанций и корректирующей добавки

$$M_D^{res} = M_D - C,$$

была применена для анализа разнообразия однонуклеотидных мутаций в сконструированной выборке. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Мы предложили новый подход к проведению сравнения нуклеотидных последовательностей. Итоговая матрица дистанций позволяет выявлять группы ближайших по количеству мутаций последовательностей между двумя выборками (all-vs-all) быстрее, чем при применении blastn. В перспективе подход может быть применен не только для последовательностей SARS-CoV-2, но для выборки любых последовательностей с определенным списком мутаций относительно выбранного референса.

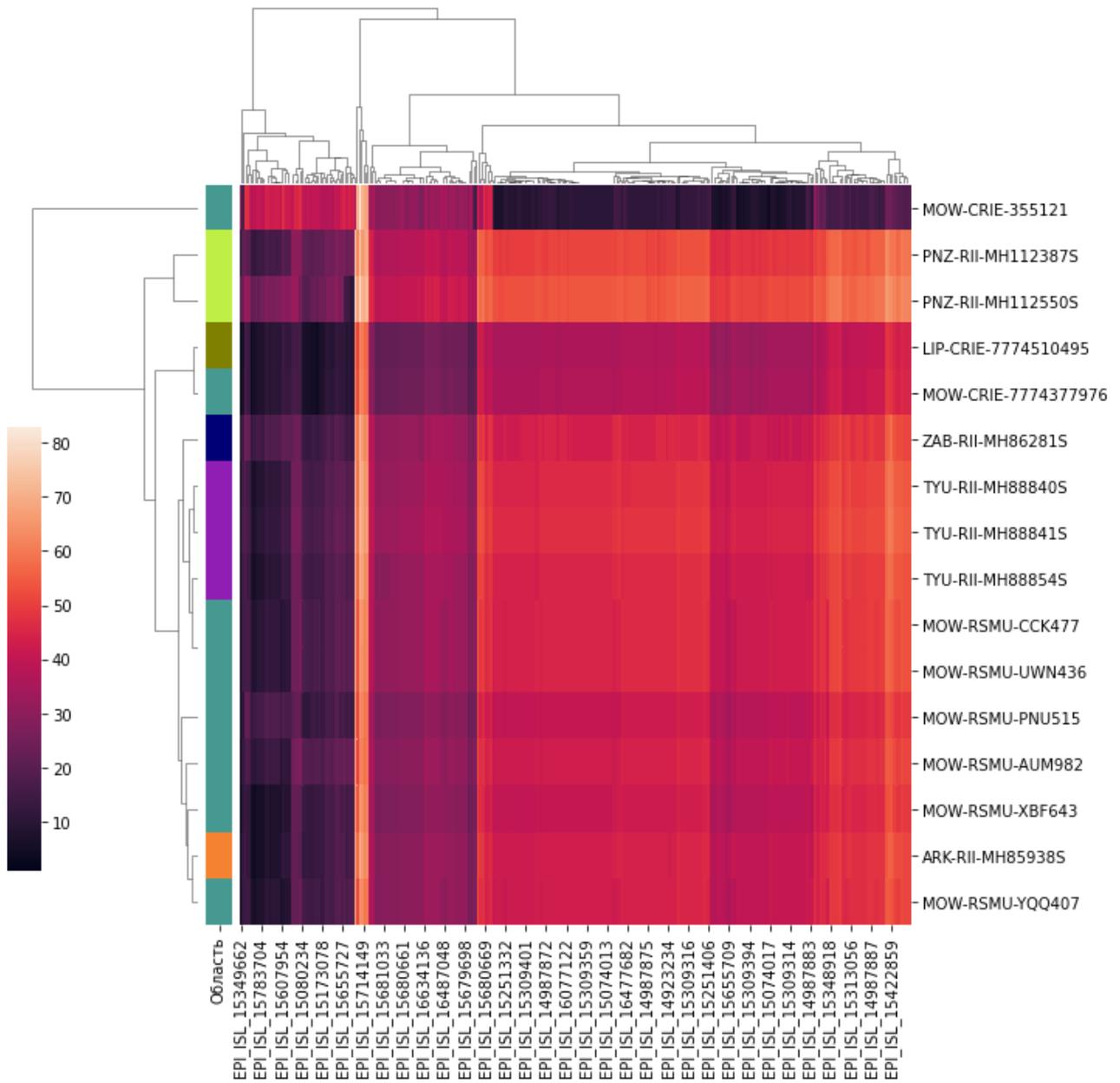


Рисунок 1. Двумерная иерархическая кластеризация расстояний между последовательностями с высоким покрытием из GISAID с датой забора от 01.09.2022 до 07.09.2022 из Азии (297 геномов) и России (16 геномов)

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FLG-NA-2-4M2E ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЭПИТОПА БЕЛКА NP

Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ожерельева О.О., Цыбалова Л.М.

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

Актуальность. Одним из подходов в разработке «универсальной» гриппозной вакцины является использование консервативных белков (M1, M2, NP, вторая субъединица гемагглютинаина HA2). Ранее нами была показана высокая иммуногенность и протективность кандидатной вакцины на основе рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e. С целью расширения кросс-протективного потенциала в конструкцию был включен дополнительный Т-клеточный эпитоп белка NP между последовательностью Flg и HA2. В настоящей работе проводилось сравнение иммуногенности белков Flg-HA2-2-4M2e и Flg-NP-HA2-2-4M2e.

Цель исследования. Сравнение иммуногенности рекомбинантного белка, несущего антигена вируса гриппа с включением эпитопа NP и без него при подкожном введении мышам разных генетических линий.

Материалы и методы. Белок Flg-HA2-2-4M2e содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии M2e (M2h-M2s-M2h-M2s). Белок Flg-NP-HA2-2-4M2e дополнительно включает Т-клеточный эпитоп белка NP (335-350).

В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c и C57BL/6 массой 16-18г. Мышей иммунизировали подкожно трехкратно с интервалом 2 недели в дозе 10мкг/мышь. Контрольной группе мышам вводили подкожно 10мкл ФБР. Через 2 недели после 3й иммунизации проводили забор крови, бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ) и селезенок. В сыворотках и БАЛ с использованием ИФА оценивали уровень IgG к синтетическим пептидам M2e, а также к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Для изучения Т-клеточного ответа, получали суспензию спленоцитов. Стимуляцию проводили синтетическим пептидам M2e, NP (335-350) и вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в течение 6 и 24 часов соответственно. Оценивали уровни антиген-специфических CD4em и CD8em экспрессирующих цитокины TNF- α , IFN- γ , IL-2. Достоверность статистических различий оценивали в GraphPad Prism 9.5.1, дисперсионный анализ, тест Тьюки.

Результаты. Трехкратная иммунизация мышам линии Balb/c приводила к формированию высоких уровней анти-M2e IgG в сыворотках при иммунизации обоими исследуемыми белками. Однако, в БАЛ достоверный прирост анти-M2e IgG наблюдался только у мышам, иммунизированных белком Flg-HA2-2-4M2e (Рисунок 1). Формирование H3N2-специфических CD8em и CD4em IFN γ + в селезенках отмечено только при иммунизации белком Flg-HA2-2-4M2e. У мышам линии C57BL/6 показано формирование H3N2-специфических CD8em и CD4em IFN γ + в селезенках для обоих исследуемых белков. Вместе с тем, M2e-специфические CD4em наблюдались только при иммунизации белком

Flg-HA2-2-4M2e. При иммунизации Flg-NP-HA2-2-4M2e отмечено формирование пула NP-специфических CD8em IFNg+ клеток у мышей линии C57BL/6 и CD8em TNFa+ и CD4em IFNg+ у мышей линии Balb/c.

Заключение. Включение эпитопа NP в рекомбинантный белок, хоть и приводило к формированию NP-специфических Т-клеток памяти, но при этом наблюдалось снижение уровня анти-M2e антител в БАЛ мышей. Также при иммунизации рекомбинантным белком, включающим последовательность эпитопа NP, отсутствовали клетки памяти специфичные к M2e. Вероятно это связано с разной степенью биодоступности и конкурентности NP (335-350) и эктодомена белка M2 (M2e).

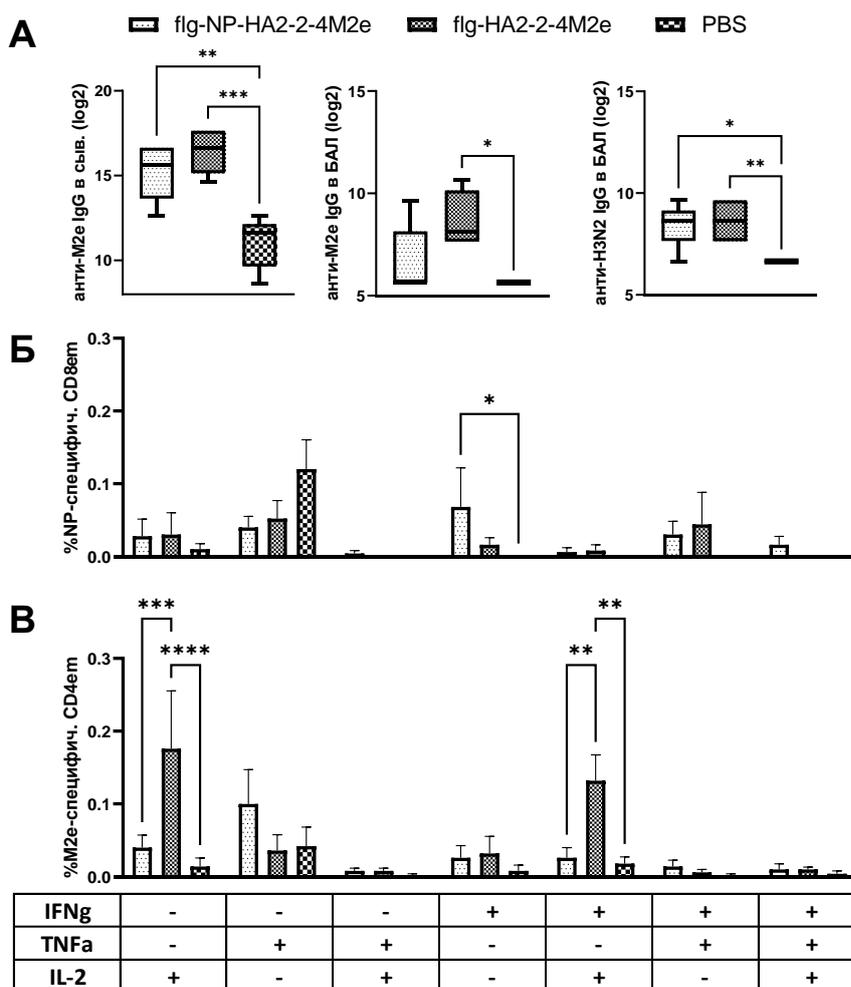


Рисунок 1. Специфический иммунный ответ при иммунизации рекомбинантными белками. А – уровни специфических IgG в селезенках и БАЛ у мышей линии Balb/c; Б – % NP-специфических CD8+ эффекторных клеток памяти в селезенках мышей C57Bl6; В - % M2e-специфических CD4+ эффекторных клеток памяти в селезенках мышей C57Bl6. Уровень значимости различий: * - p<0.05; ** - p<0.01; *** - p<0.001; **** - p<0.0001.

ПРОВЕРКА ЭФФЕКТИВНОСТИ *in vitro* ТРАНСКРИПЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ Т7 РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

Юрченко А.В.^{1,2}, Добровольская О.А.^{1,2}, Елпаева Е.А.¹

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

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

РНК-вакцины являются одним из наиболее перспективных направлений современной вакцинологии. В настоящее время проходят клинические испытания несколько десятков РНК-вакцин против COVID-19 и других социально значимых заболеваний. мРНК обладают широким терапевтическим потенциалом и могут стать альтернативой классическим вакцинам в связи с их высокой эффективностью, возможностью быстрой разработки и потенциально дешёвым производством. Также, поскольку в препаратах на основе мРНК отсутствуют дополнительные последовательности, такие как плазмидный остов, снижен риск формирования аутоантител.

Транскрибированная *in vitro* мРНК (IVT мРНК) сконструирована таким образом, чтобы структурно напоминать встречающуюся в природе зрелую мРНК в цитоплазме эукариотических клеток. Так, IVT мРНК является одноцепочечной, имеет 5'-кэп структуру для инициации трансляции, а также 3'-поли(А). Открытая рамка считывания, кодирующая белок интереса, имеет старт и стоп-кодоны и окружена нетранслируемыми областями. Терапевтические мРНК получают в ходе *in vitro* транскрипции, катализируемой ДНК-зависимыми РНК-полимеразами. Принцип действия этих ферментов заключается в удлинении цепи РНК путем образования 3'-5' фосфодиэфирных связей с использованием рибонуклеозидных 5'-трифосфатов (rNTPs) в качестве субстратов и высвобождения пирофосфата в качестве продукта реакции.

Целью исследования было определить эффективность реакций *in vitro* транскрипции (IVT) и полиаденилирования, катализируемых оригинальными рекомбинантными ферментами Т7 РНК-полимеразы и полиаденилат-полимеразы. В качестве матрицы для синтеза мРНК была получена плазмидная конструкция, кодирующая ген зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в векторе pJet1.2, содержащего Т7-промотор. Для контроля эффективности параллельно проводили *in vitro* транскрипцию и кэпирование с помощью коммерческого набора HighYield T7 ARCA mRNA Synthesis Kit (Jena Bioscience, #RNT-102) и полиаденилирование с помощью коммерческого набора Poly(A) Tailing Enzyme Testkit (Jena Bioscience, #RNT-004).

Для разработки методов получения мРНК методом IVT, были получены штаммы продуценты рекомбинантных белков Т7 РНК-полимеразы и полиаденилат-полимеразы на основе клеток *E. coli* BL21 DE3.

В ходе *in vitro* транскрипции (IVT) гена eGFP были получены образцы мРНК, размеры которых при электрофоретическом разделении в агарозном геле соответствуют теоретическим до и после полиаденилирования. Кэпирование полученных мРНК проводили

с использованием отечественных реактивов (ООО «Биолабмикс»). Было отмечено, что использование различного молярного соотношения нуклеотидов к кЭП-структуре, при проведении реакций IVT может увеличить выход зрелых мРНК (Рисунок 1). Реакции *in vitro* транскрипции, кЭпирования и полиаденилирования прошли успешно как для образцов, полученных с помощью рекомбинантой T7 РНК-полимеразы и полиаденилат-полимеразы, так и для продуктов, синтезированных с помощью коммерческих наборов.

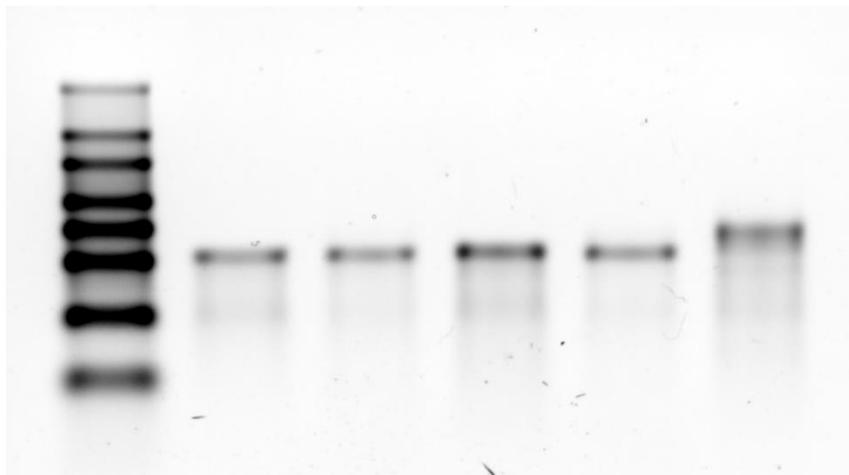


Рисунок 1. Электрофореграмма мРНК, полученных с помощью оригинальных рекомбинантных ферментов (T7 РНК-полимеразы и полиаденилат-полимеразы). На дорожке 2 показана мРНК без 5'-кЭп и без 3'-полиА-структур. На дорожках 3 и 5 представлена мРНК с 5'-кЭп структурой, но до реакции полиаденилирования при молярном соотношении нуклеотидов к кЭП-структуре 1:2 и 1:4, соответственно. На дорожках 4 и 6 – мРНК с 5'-кЭп и 3'-полиА структурами при молярном соотношении нуклеотидов к КЭП-структуре 1:2 и 1:4, соответственно. В качестве маркера молекулярного веса был использован RiboRuler High Range RNA Ladder (дорожка 1)

По результатам исследования можно сделать вывод, что реакции *in vitro* транскрипции и полиаденилирования проходят так же эффективно с использованием оригинальных рекомбинантных белков, как и с использованием ферментов из коммерческого набора. Синтезированные белки можно успешно использовать для дальнейших экспериментов по транскрипции исследуемых генов.

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К КЛИНИКЕ

Сборник тезисов
Всероссийской конференции молодых ученых

Санкт-Петербург

13–14 апреля 2023 года

Налоговая льгота – Общероссийский классификатор продукции
ОК 005-93, т. 2; 95 3004 – научная и производственная литература

Подписано в печать 03.04.2023. Формат 60×84/8. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 13,75. Тираж 50. Заказ 1592.

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.

