

Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза

Д.И.Павельев, Л.Ф.Стовба, М.Н.Писцов, В.Н.Лебедев, С.В.Борисевич

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Необходимость получения новой вакцины против туберкулеза обусловлена тем, что применяемая на протяжении последних 90 лет вакцина Кальметта–Гирена (BCG) вызывает умеренную защиту против распространения милиарного и диссеминированного туберкулеза у детей, однако она не в состоянии защитить взрослое население от заражения *Mycobacterium tuberculosis*, и тем более ее нельзя применять для больных СПИДом.

В настоящее время большое внимание уделяется созданию векторных вакцин против возбудителей бактериальной и вирусной природы. На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса вакцины была сконструирована вакцина MVA85A, в геном которой встроены гены иммунодоминантного белка *Mycobacterium tuberculosis* – 85A. Во всех клинических экспериментах эта вакцина применялась в качестве бустерной при праймировании вакциной Кальметта–Гирена. На здоровых взрослых волонтерах, пациентах, больных СПИДом и с латентной формой туберкулеза, подростках и детях была показана ее безопасность при различных способах применения (внутрикожном, внутримышечном и аэрозольном) и разных дозах. Вакцина индуцировала Т-клеточный иммунный ответ, однако не защищала от дальнейшего заражения туберкулезом. Это явилось стимулом для создания мультивалентных вакцин, экспрессирующих основные эпитопы антигенов возбудителя туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, штамм MVA вируса вакцины, праймирование, бустерное, иммунодоминантные белки, иммунный ответ, аттенуированный штамм

Для цитирования: Павельев Д.И., Стовба Л.Ф., Писцов М.Н., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза. Бактериология. 2018; 3(2): 43–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-43-50

Use of the recombinant attenuated MVA strain of the vaccine virus as a vector vaccine for immunization against tuberculosis

D.I.Pavelev, L.F.Stovba, M.N.Pistcov, V.N.Lebedev, S.V.Borisevich

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad-6, Russian Federation

The used for 90 years Calmett–Giren vaccine (BCG) is alone accessible licensed vaccine against tuberculosis. It causes moderate not long duration protection of children against tuberculosis and is impossible to protect of adult against *Mycobacterium tuberculosis* invasion. It is conditioned the necessity of generation of novelty vaccines.

In present time the great attention is spared of creature of novelty vector recombinant vaccines, based on highly attenuated strain MVA of vaccine virus. The vaccine MVA85, that contains the gene of immunodominant protein *Mycobacterium tuberculosis* 85A, is constructed. In everybody clinical experiments this vaccine was used for busting with the BCG for priming/Its safety and possibility to form of T-cell immune reply was shown on adult volunteers. Its effect by intramuscular, subcutaneous and aerosol routes of immunization is evaluated. The vaccine was safe for children, adult and AIDs patients and caused of specific T-cell immune reply, but don't protects from following invasion of *Mycobacterium tuberculosis*. It stimulates the creature of multivalent vaccine, containing the major epitopes of antigens of tuberculosis agent.

Keywords: tuberculosis, MVA strain of vaccinia virus, prime immunization, buster immunization, immunodominant proteins, immune response, attenuated strain

For citation: Pavelev D.I., Stovba L.F., Pistcov M.N., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Use of the recombinant attenuated MVA strain of the vaccine virus as a vector vaccine for immunization against tuberculosis. Bacteriology. 2018; 3(2): 43–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-43-50

Для корреспонденции:

Борисевич Сергей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, начальник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Адрес: 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Статья поступила 24.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Sergey V. Borisevich, Doctor of Science (Biology), professor, corresponding fellow of RAS, head «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of the Defense of the Russian Federation

Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

The article was received 24.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Туберкулез является социально значимой инфекцией. Ежегодно регистрируется около 9 млн новых случаев заболевания, а 1,5 млн человек умирают от этой болезни [1, 2].

Этиологическим агентом туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Этим возбудителем инфицировано около 30% населения Земли, а в странах Азии и Западной Африки туберкулез является эндемичным заболеванием [3]. *M. tuberculosis* распространяется аэрозольным путем. Заболевание затрагивает в основном легкие, но иногда и другие органы: селезенку, желудок, кишечник, мозг. Инфицирование человека приводит как к активной форме заболевания, так и, в большинстве случаев, к латентной. В 10% случаев латентная инфекция реактивируется в течение жизни. Коинфицирование вирусом иммунодефицита человека, который эндемичен на тех же территориях, что и *M. tuberculosis*, повышает риск реактивации латентной инфекции. Этой реактивации также подвержены люди с генетической дефицитностью интерферона- γ (IFN- γ) и пациенты, получавшие блокирующую терапию против фактора некроза опухолей- α (TNF- α) [2, 4].

Для решения проблемы ограничения или полной ликвидации распространения этого социально значимого заболевания разрабатываются новые препараты для вакцинации и новые режимы вакцинации [5–8].

В связи со снижением противоопухолевого популяционного иммунитета свойства вируса вакцины (ВВ) делают его идеальным кандидатом для использования в качестве вектора при создании векторных вакцин. Преимущества ВВ как вектора, впервые описанные Moss и Paoletti в 1982 г. [9, 10], следующие: широкий круг хозяев вектора, позволяющий рекомбинантному гену экспрессировать в клетках животных и птиц, быстрая наработка рекомбинантного белка при высокой множественности инфицирования, различные природные и синтетические промоторы позволяют осуществлять высокие уровни экспрессии чужеродного белка [11]; высокомолекулярный геном позволяет встроить до 25 тыс. п. о. чужеродной ДНК, в том числе и гены цитокинов, модулирующих иммунный ответ [12]; транзитная природа ВВ-экспрессирующей системы обходит проблемы трансформации клеточных линий; функциональное картирование генома позво-

лило определить более 10 сайтов для встраивания чужеродной ДНК [13]; цитоплазматическая ВВ-транскрипционная машина позволяет избежать сложностей, ассоциированных с регуляцией экспорта несплайсированных РНК в ядра, что характерно для некоторых белков (например, структурных белков лентивируса приматов); стимуляция гуморального и клеточного иммунитета [11].

Основными недостатками ВВ в качестве рекомбинантной вакцины являются низкая эффективность его повторного использования, потенциальная реактогенность самого векторного вируса и возможность диссоциации у иммунокомпromиссных лиц [14]. Поэтому для вакцинации предлагается применять аттенуированные штаммы.

Одним из наиболее аттенуированных штаммов ВВ является штамм MVA (modified vaccinia Ankara), который был получен после пассирования на фибробластах куриных эмбрионов родительского штамма Анкара, что привело к потере 15% генома исходного штамма вируса [15]. Результатом множественных делеций является возможность интеграции в геном вируса большого объема чужеродной информации.

Проведенные недавно клинические испытания подтвердили его исключительную безопасность для человека (табл. 1) [16].

Исследования последних лет показали, что уровни гуморального и клеточного иммунитета могут быть значительно увеличены при применении комбинированных вакцин в режиме гетерологичного праймирования/бустирования (табл. 2) [17, 18]. Такая стратегия вакцинирования увеличивает степень напряженности и специфичность Т-клеточного иммунитета и способствует формированию Т-клеточной памяти.

Основной подход специфической профилактики туберкулеза в настоящее время состоит в том, что праймирование проводится вакциной BCG (bacilli Calmette-Guerin), а бустирование – рекомбинантным MVA-штаммом, экспрессирующим иммунодоминантный белок 85A *M. tuberculosis* (MVA85A) [17, 19]. Важно отметить, что штамм MVA85A сам индуцирует высокие уровни 85A специфических CD4⁺ клеток у BCG вакцинированных субъектов [20].

После исследований по оценке эффективности вакцины MVA85A на животных были проведены ее клинические ис-

Таблица 1. Место, сроки и количество волонтеров, возраст и их медицинский статус, а также метод введения экспериментальных образцов вакцин MVA85A, экспрессирующих иммунодоминантный антиген 85A, против туберкулеза

Место проведения	Сроки проведения	Количество волонтеров, человек	Возраст волонтеров, лет	Медицинский статус волонтеров	Метод введения	Источник литературы
1	2	3	4	5	6	7
Кейптаун (Южная Африка)	сентябрь 2005 г.– июнь 2006 г.	24	18–50	Здоровые	в/к	[19]
Великобритания	10 ноября 2011 г.– 1 ноября 2012 г.	24	18–55	Здоровые	в/к, в/м	[13]
Кейптаун (Южная Африка), Дакар (Сенегал)	4 августа 2011 г.– 24 апреля 2013 г.	1233	18–50	Больные СПИДом без явных признаков туберкулеза	в/к	[17]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	48	18–50	Инфицированные <i>M. tuberculosis</i> w/или ВИЧ		[18]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	12 подростков и 24 ребенка	Н.д.	Здоровые		[20]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	144 ребенка	5–12 мес			[16]
Сельский район вблизи Кейптауна (Южная Африка)	июнь 2009 г.– май 2011 г.	2797 детей	3–37 мес			[14]

в/к – внутривенно, в/м – внутримышечно, Н.д. – нет данных.

пытания (между сентябрем 2005 г. и июнем 2006 г.) на волонтерах в возрасте 18–50 лет (средний возраст 35,5 года) в Южной Африке вблизи Кейптауна, где туберкулез является эндемичным заболеванием. У волонтеров не было признаков активного туберкулеза, не выявлялось инфицирования ВИЧ-1 и *M. tuberculosis* [22]. Все они ранее были привиты вакциной BCG. Вакцину MVA85A инъецировали внутрикожно (в/к) в дозе 5×10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ).

В течение всего срока наблюдения (1 год) у волонтеров не наблюдалось сильно выраженных побочных явлений, связанных с иммунизацией. Местная реакция на прививку проявлялась в припухлости, покраснении, зуде, легком раздражении, ограничении в движении рукой, покраснении в месте инъекции вакцины, которые исчезали через неделю. Общая реакция заключалась в недомогании, усталости, в легкой лихорадке, артралгии, головной боли, миалгии, тошноте, которые проходили через 7 дней после иммунизации.

Таблица 2. Результаты изучения реактогенности и иммуногенности экспериментальных образцов вакцин MVA85A, экспрессирующих иммунодоминантный антиген 85A возбудителя туберкулеза

Иммунизирующая доза, БОЕ	Реактогенность				Иммунный ответ к экспрессирующим генам		Источник литературы
	местная реакция, %		общая реакция, %		гуморальный	клеточный	
$5,0 \times 10^7$	припухлость в месте введения	96	недомогание	33	Наличие Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ	Наличие CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клеток	[19]
	зуд	50	утомляемость	33			
	легкое раздражение	50	легкая лихорадка	46			
	ограниченность движения рукой	13	артралгия	33			
	болезненность	38	головная боль	54			
	покраснение	71	миалгия	13			
	–	–	тошнота	9			
$5,0 \times 10^8$	болезненность в месте введения	Н.д.	усталость	67	Наличие сывороточного IgG к 85A с более высоким уровнем при в/к иммунизации	Регистрация значительных количеств IFN- γ , TNF- α , рецепторов цитокинов при обоих способах иммунизации	[13]
	эритема	Н.д.	головная боль	46			
	припухлость – меньше при в/м введении	Н.д.	недомогание	38			
$1,0 \times 10^7$	При аэрозольном применении – легкие побочные реакции на уровне плацебо	Н.д.	При аэрозольном применении: возбуждение	8	При аэрозольном и в/к применении наличие анти-MVAIgG, анти-MVAIgM, анти-MVAIgA Т-клеток, экспрессирующие MVA85A IFN- γ	При аэрозольном применении – наличие Ag 85A – специфических CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клеток. Наличие MVA CD4 ⁺ и MVA CD8 ⁺ Т-клеток	[10]
			утомление	42			
			головная боль	42			
	При в/к – эритема, припухлость в месте вакцинации	Н.д.	При в/к применении лихорадка	8			
			возбуждение	8			
			артралгия	8			
			миалгия	17			
			утомление	50			
			головная боль	42			
$1,0 \times 10^8$	Локальные поражения в месте введения, мягкие гриппоподобные симптомы, региональная лимфаденопатия	Н.д.	Туберкулезный менингит	1	Наличие незначительного Ag 85A-специфического	Наличие 85A-специфических CD4 ⁺ Т-клеточных, представленных в виде IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17 цитокинов, незначительных CD8 ⁺ Т-клеточных	[17]
$5,0 \times 10^7$	припухлость	100	миалгия	15	Н.д.	Наличие MVA85A-индуцированных CD4 ⁺ Т-клеточных, представленных IFN- γ , TNF- α , IL-12 цитокинами и CD8 ⁺ полифункциональными Т-клетками	[18]
	шелушение	79	усталость	13			
	болезненность	48	недомогание	15			
	легкое раздражение	45	головная боль	27			
	зуд	81	–	–			
	покраснение	100	–	–			
$5,0 \times 10^7$	у подростков кожные поражения в месте введения вакцины	Н.д.	средней тяжести инфекции верхних дыхательных путей	13,4	Н.д.	Наличие CD4 ⁺ Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17 цитокины у детей и подростков; у детей – дополнительно GM-CSF	[20]
	У детей: мягкие	96	ложные позывы	6,25			
	средние	2,7	–	–			
	тяжелые	1	–	–			

Таблица 2. Окончание

Иммунизирующая доза, БОЕ	Реактогенность				Иммунный ответ к экспрессирующим генам		Источник литературы
	местная реакция, %		общая реакция, %		гуморальный	клеточный	
2,5 × 10 ⁷ , 5,0 × 10 ⁷ , 1,0 × 10 ⁸	краснота	94,4 (2,5 × 10 ⁷)	недомогание	2,8 (2,5 × 10 ⁷)	Н.д.	Н.д.	[16]
		100 (5 × 10 ⁷)		2,8 (5 × 10 ⁷)			
		100 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)			
	припухлость	94,4 (2,5 × 10 ⁷)	вялость	2,8 (2,5 × 10 ⁷)			
		100 (5 × 10 ⁷)		2,8 (1 × 10 ⁸)			
		100 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)			
	болезненность	8,3 (2,5 × 10 ⁷)	тактильная лихорадка	11 (2,5 × 10 ⁷)			
		13,9 (5 × 10 ⁷)		19,4 (5 × 10 ⁷)			
		22,2 (1 × 10 ⁸)		19,4 (1 × 10 ⁸)			
	легкое раздражение	5,6 (2,5 × 10 ⁷)	температура >37,5°C	8,3 (2,5 × 10 ⁷)			
5,6 (5 × 10 ⁷)		11,1 (2,5 × 10 ⁷)					
8,3 (1 × 10 ⁸)		16,7 (1 × 10 ⁸)					
шелушение	22,2 (2,5 × 10 ⁷)	рвота	5,6 (2,5 × 10 ⁷)				
	44,4 (5 × 10 ⁷)		0 (5 × 10 ⁷)				
	63,9 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)				
1,0 × 10 ⁸	По одной реакции	89	По одной реакции	80	Н.д.	Наличие Ag 85A-специфических CD4 ⁺ клеточных, представленных IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-17 цитокинами	[14]

*В обеих группах, которым вводили внутривенно и внутримышечно экспериментальные образцы вакцин, уровни общих реакций одинаковые; Н.д. – нет данных.

Иммунизация индуцировала экспрессию IFN-γ, TNF-α, интерлейкина-2 (IL-2), IL-17 цитокинов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, количество которых превышало базовый уровень, наблюдаемый до иммунизации, вызванный прививкой BCG. Пик Т-клеточного иммунного ответа приходился на 7-е сутки после бустерной иммунизации и сохранялся 364 дня, т.е. в течение всего срока наблюдения. Гуморальный иммунный ответ, определенный в ИФА с использованием метода отпечатков, показал наличие 85А-специфических клеток, экспрессирующих IFN-γ. Результаты настоящего испытания показали, что вакцина может быть рекомендована для иммунизации взрослого населения в эндемичных по туберкулезу районах.

В 2009 г. в Великобритании вакцину MVA85A (№ 010507) использовали в качестве бустерной для сравнительной оценки в/к и внутримышечного (в/м) способов иммунизации в фазе 1 клинических испытаний (регистрационный № NCT1181856). Все волонтеры (24 человека в возрасте 18–55 лет) были предварительно вакцинированы BCG вакциной (прайм-иммунизация) по крайней мере за 6 мес до начала эксперимента. Все они были здоровы и имели отрицательные результаты по инфицированию вирусами гепатита В, С и ВИЧ, также у них не было обнаружено латентной туберкулезной инфекции. Волонтеры были рандомизированно поделены на 2 группы (1 : 1). Волонтеров группы А иммунизировали в/м дозой 1 × 10⁸ БОЕ MVA85A, группы В – той же дозой в/к [23].

Все испытуемые хорошо перенесли иммунизацию, за исключением одного человека, у которого наблюдалось повышение температуры до 37,5°C в течение первых 29 ч. Серьезных побочных явлений, связанных с вакцинацией, не наблюдалось в обеих группах. Клинически значимых различий в симптомах не было в обеих группах.

Исследование не выявило различий в клеточной иммуногенности при этих способах заражения. Оба способа иммунизации генерировали сильный Ag85A-специфический им-

мунный ответ и индуцировали полифункциональные CD4⁺ Т-клетки и рецепторы цитокинов. Пиковые значения IFN-γ наблюдались к 7-м суткам, причем более высокие при в/к способе введения, однако к 24 нед различий между группами не выявлено. Гуморальный иммунный ответ к Ag85A оценивался на 0, 2 и 24-й неделе после иммунизации. Волонтеры, иммунизированные в/к, имели более высокий уровень IgG антител. Однако достоверность этих данных не подтверждена статистически из-за небольшого числа испытуемых.

Поскольку заражение туберкулезом происходит аэрозольным путем при вдыхании инфицированного аэрозоля, возникла необходимость его изучения, так как доставка противотуберкулезной вакцины на слизистую оболочку респираторного тракта может повысить локальный иммунный ответ непосредственно на месте инфицирования. Кроме того, ранее было выявлено, что рекомбинантный MVA вектор, амплифицируемый на слизистую оболочку, индуцирует высокие уровни мукозального иммунитета у лабораторных животных [24].

С 10 ноября 2011 г. по 1 ноября 2012 гг. в Великобритании были проведены клинические эксперименты (фаза 1) по аэрогенной иммунизации вакциной MVA85A 24 волонтеров в возрасте 18–50 лет. Все они были здоровы, у них установлено отсутствие инфицирования вирусами гепатита В, С и ВИЧ, также у них не было обнаружено латентной туберкулезной инфекции. Все были предварительно вакцинированы BCG вакциной (прайм-иммунизация) по крайней мере за 6 мес до начала эксперимента. Волонтеры рандомизированно были поделены на 2 группы (1:1). Волонтеров группы иммунизировали дозой 1 × 10⁷ БОЕ MVA85A аэрозольным способом, группы В – той же дозой в/к [25].

Результаты наблюдений за обеими группами испытуемых свидетельствуют об отсутствии значительных побочных явлений, спровоцированных самим фактом иммунизации, на 7-е и 84-е сутки после иммунизации. Оба способа иммунизации индуцировали CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные отве-

ты, при этом CD4⁺ клеточный ответ был выше в группе с аэрозольной иммунизацией. Величина CD8⁺ клеточного ответа не различалась между группами. Оба способа иммунизации индуцировали образование CD4⁺ Т-клеточных цитокинов: IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17, однако интенсивность их образования была больше у лиц при аэрозольной иммунизации.

Анти-MVAIgG титры, определяемые на 14, 28, 84 и 168-е сутки, были значительно выше в группе лиц, иммунизированных в/к. Анти-MVAIgA титры, определяемые на 14-е сутки, были также выше при в/к иммунизации. Количество анти-MVAIgM не различалось между двумя группами. Хотя MVA специфический клеточный ответ был определен в обеих группах, титр сывороточных антител к самому вирусному вектору был больше во второй группе при в/к иммунизации.

Следовательно, в фазе 1 клинических испытаний показано, что аэрозольный способ бустерной иммунизации MVA85A является безопасным и способен вызвать формирование выраженного гуморального и Т-клеточного иммунного ответов.

Как упоминалось ранее, людей с иммунодефицитными состояниями нельзя иммунизировать BCG вакциной. Поэтому результаты клинических испытаний по иммунизации вакциной MVA85A волонтеров, больных СПИДом, представляют особый интерес [2].

Испытания проводились в Кейптауне, Южная Африка, и в Дакаре, Сенегал, в период с 4 августа 2011 г. по 24 апреля 2013 г. Для испытания в фазе 2 было отобрано 1233 волонтера, инфицированных ВИЧ-1, в возрасте 18–50 лет, без явных признаков туберкулеза, с содержанием CD4 более 350 клеток/мкл у лиц, ранее никогда не получавших антиретровирусную терапию, и более 300 клеток/мкл – получавших антиретровирусную терапию. Критерием отбора для проведения испытаний лиц с латентной формой туберкулеза являлся не менее чем пятимесячный интервал после завершения курса приема изониазида.

Волонтеры были рандомизированно разделены на 2 группы, без учета их статуса ВИЧ-инфицирования. В первой группе из 649 человек оценивались безопасность, иммуногенность и эффективность вакцины MVA85A, оставшиеся включены в группу ретроспективного анализа. 324 волонтерам из первой группы в/к инъекцировали вакцину MVA85A, 325 – плацебо. Второе бустерное введение вакцины MVA85A либо плацебо было проведено через 6–12 мес.

Иммуногенность вакцины оценивалась на 7-е и 28-е сутки после первой и второй иммунизаций, а возможное инфицирование *M. tuberculosis* регистрировалось в течение всего периода испытания. Помимо этого, у волонтеров определялось количество CD4-клеток при каждой процедуре.

Результаты испытания выявили, что по крайней мере один побочный эффект отмечен у 312 пациентов из группы плацебо и у 321 – в MVA85A группе. Они в основном представляли собой локальные поражения в месте введения. У некоторых наблюдались легкие гриппоподобные симптомы и региональная лимфаденопатия. Всего в обеих группах было зарегистрировано 17 серьезных побочных эффектов. Все они, за исключением одного, не были связаны с вакцинацией.

MVA85A вакцина индуцировала Ag85A-специфический Т-клеточный ответ с пиком на 7-е сутки после первой и бус-

терной иммунизаций. В основном он был представлен IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокинами. Количество CD8⁺ Т-клеток было незначительным. Ag85A-специфический антительный ответ был очень невысоким.

К сожалению, эта вакцина не защищала против заражения *M. tuberculosis*, что было определено квантифероновым (QFT) методом. Количество волонтеров, которые из QFT-отрицательных на начало опыта стали QFT-положительными к концу испытания, составляло 20% иммунизированных MVA85A и 23% в группе, которой введено плацебо, независимо от получаемой антиретровирусной терапии.

Следовательно, выявляемый после применения вакцины MVA85A иммунный ответ был недостаточно эффективным, чтобы защитить от инфицирования *M. tuberculosis*.

Ранее было показано, что вакцина MVA85A безопасна и иммуногенна для лиц с латентной инфекцией *M. tuberculosis* [26]. Поскольку инфицирование ВИЧ повышает риск развития туберкулеза более чем в 10 раз, даже при относительно высоком содержании CD4⁺ Т-клеток, то возникла необходимость оценить эффективность этой вакцины на ВИЧ-инфицированных с латентной формой туберкулеза.

Испытание (фаза 2а) проводилось в Кейптауне в 2010–2011 гг. 48 добровольцев были разделены на 4 группы по 12 человек [27]. Группа 1 состояла из ВИЧ-неинфицированных волонтеров с латентной туберкулезной инфекцией. Группа 2 представлена ВИЧ-инфицированными, никогда не проходившими антиретровирусную терапию, волонтерами без латентной микобактериальной инфекции. Группа 3 – ВИЧ-инфицированные волонтеры, не проходившие курс антиретровирусной терапии с латентной микобактериальной инфекцией. Группа 4 – ВИЧ-инфицированные волонтеры, которые стабильно в течение более чем одного года получали антиретровирусную терапию, независимо от инфицирования *M. tuberculosis*. В группы 2 и 3 отбирались волонтеры с ВИЧ-инфекцией, диагностированной более чем за 3 мес до отбора. Возраст волонтеров от 18 до 50 лет (средний возраст по группам – 34–36 лет). Вакцина MVA85A вводилась в/к в дозе 5×10^7 БОЕ. В течение срока наблюдения (52 нед) было установлено, что серьезных побочных явлений не наблюдалось, за исключением легких побочных реакций в месте введения. Все местные реакции были легкой степени и проходили к 14-му дню. В 4-й группе они классифицировались скорее как средние. Общие реакции начинались на 2-е сутки и проходили к 28-му дню. Вакцина индуцировала сильный продолжительный иммунный ответ, представленный в основном полифункциональными CD4⁺ Т-клетками. Во всех 4 группах индуцировались IFN- γ , TNF- α , IL-2 цитокины. В группе 1, помимо них, отмечена еще индукция IL-17 цитокина. Общее количество CD4⁺ Т-клеток, индуцированных вакциной, было меньше у ВИЧ инфицированных волонтеров в группе 2. Антиретровирусная терапия не оказывала эффекта на иммуногенность вакцины. CD8⁺ Т-клетки не выявлены во всех 4 группах. Результаты этого испытания свидетельствовали, что MVA85A вакцина является безопасной и вызывает иммунный ответ у ВИЧ-инфицированных с латентной туберкулезной инфекцией.

Помимо испытания этой вакцины на взрослых волонтерах, она была исследована на подростках и детях. Вакцина

MVA85A оценивалась (фаза I/IIa) на 12 здоровых подростках в возрасте 13,3–15,0 лет (средний возраст 14,4 года) и 24 здоровых детей в возрасте 1,4–7,7 года (средний возраст 4,3 года) в Ворчестере (Южная Африка в 110 км от Кейптауна) в период с ноября 2006 г. по январь 2008 г. Все испытуемые были привиты вакциной BCG при рождении. Вакцина MVA85A вводилась п/к в дозе 5×10^7 БОЕ [28].

Все испытуемые хорошо перенесли иммунизацию. В группе подростков отмечались 64 побочные реакции, которые классифицированы как легкие и средние, тяжелых реакций не отмечено. Побочные реакции были сильно выражены в течение 2 дней после иммунизации, у 62% они проходили через 7 сут, у 30% – через 14, у оставшихся – через 28 сут после иммунизации.

В группе иммунизированных детей зафиксировано 112 побочных реакций, в основном представленных местными реакциями в месте введения вакцины. Реакции средней тяжести были связаны с подъемом температуры в первую неделю после вакцинации. 42% побочных явлений проходили к 7-м суткам, 49% – к 28-м суткам, 7% – к 84-м суткам и 1,8% – к 168-м суткам.

Вакцина MVA85A индуцировала сильный, длительный Т-клеточный иммунный ответ, представленный в основном полифункциональными CD4⁺ Т-клетками, экспрессирующими доминирующие IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокины, которые наблюдались в обеих группах. У детей выявлена дополнительная экспрессия гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Вакцина индуцировала большее количество Т-клеток у подростков по сравнению с детьми. Ag85A специфические CD8⁺ Т-клетки не были определены после вакцинации в обеих группах. Следовательно, вакцина MVA85A безопасна для детей и подростков из эндемичного по туберкулезу района Южной Африки и индуцирует сильный длительный Т-клеточный ответ.

Безопасность и эффективность вакцины MVA85A в зависимости от применяемой дозы оценена на детях в возрасте от 5 до 12 мес в испытании (фаза 2), проведенном в Южной Африке вблизи Кейптауна в эндемичном по туберкулезу районе [29]. В испытании участвовали 144 здоровых, не инфицированных ВИЧ и *M. tuberculosis*, привитых BCG в 3-дневном возрасте детей, разделенных на 4 группы. Первая группа (средний возраст 270,5 дня) была в/к иммунизирована вакциной в дозе $2,5 \times 10^7$ БОЕ, вторая (средний возраст 278,5 дня) – 5×10^7 БОЕ, третья (средний возраст 188 дней) – 1×10^8 БОЕ, четвертая (средний возраст 252,5 дня) – плацебо.

Результаты испытания показали, что вакцина была безопасна при применении всех трех доз. Не отмечено выраженных побочных явлений, связанных с вакцинацией. Она индуцировала сильный, длительный, выявляемый на 168-е сутки (срок наблюдения) полифункциональный CD4⁺ Т-клеточный иммунный ответ, не зависящий от возраста испытуемых и дозы вакцины, представленный IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокинами и GM-CSF. Она также индуцировала на низком уровне CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ, представленный образованием IFN- γ . Сделан вывод о том, что вакцина MVA85A индуцирует полифункциональный CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ у детей и может быть использована для их иммунизации.

Другие результаты получены в клиническом испытании этой вакцины (фаза IIb), проведенном в сельском районе вблизи Кейптауна в ЮАР, начиная с июня 2009 г. по май 2011 г. В испытании участвовали значительно большее (2797) количество детей в возрасте от 3 до 37 мес (средний возраст 24,6 мес). Все дети были предварительно вакцинированы BCG, у всех были отрицательные показатели на ВИЧ. Все дети рандомизированно разделены на 2 группы. Первой группе (1399 детей) была в/к введена MVA85A вакцина в дозе 1×10^8 БОЕ, второй (1398 детей) – плацебо. Дети, иммунизированные вакциной MVA85A, были разделены на группы, в которых изучались безопасность, иммуногенность и протективность от заражения туберкулезом [30].

Результаты испытания показали, что вакцина MVA85A безопасна и ее введение вызывало локальные побочные эффекты в количестве, не превышающем введение плацебо. Общие реакции были связаны с инфекцией нижнего отдела респираторного тракта или гастроэнтеритом.

Вакцина MVA85A индуцировала Ag85A-специфический Т-клеточный ответ. CD4⁺ Т-клетки преимущественно экспрессировали IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17. Подобные цитокины не были определены в группе испытуемых, инъецированных плацебо. CD8⁺ Т-клетки не выявлены ни в одной группе. Однако случаи заболевания туберкулезом у детей (3% в группе плацебо и 2% в группе иммунизированных MVA85A вакциной) не позволяют однозначно оценить защитную эффективность этой вакцины. Кроме того, отмечено, что 13% иммунизированных детей и 12% в группе плацебо были инфицированы *M. tuberculosis*, что определялось QFT-тестом. Эффективность MVA85A вакцины в условиях данного клинического испытания получила оценку 3,8%.

Основным объяснением отсутствия защиты при проведении использованной схемы иммунизации авторы исследования считают недостаточное развитие иммунной системы у детей этого возраста, что приводит к меньшему защитному эффекту как при вакцинации вакциной BCG, так и при иммунизации вакциной MVA85A [31].

Результаты клинических испытаний вакцины MVA85A, экспрессирующей антиген 85A *Mycobacterium tuberculosis*, представлены в таблице 1.

Поскольку проведенные клинические испытания показали, что применение вакцины MVA85A, экспрессирующей только один иммунодоминантный антиген возбудителя туберкулеза, приводит к неоднозначным результатам, проводятся исследования по конструированию рекомбинантных штаммов на основе вируса вакцины MVA со встроенными генами нескольких иммунодоминантных антигенов. Так, был получен рекомбинант MVA/IL-15/5Mtb, содержащий гены 5 микобактериальных антигенов – ESAT6, Ag85A, Ag85B, HSP65, Mtb39A, и иммуностимуляторный цитокин IL-15 как молекулярный адъювант. При испытании этой мультивалентной вакцины на мышах было показано, что MVA/IL-15/5Mtb вакцина индуцирует значительно более высокие уровни IgG антител против антигенов *M. tuberculosis*, чем BCG-вакцина. Вакцина MVA/IL-15/5Mtb также защищала мышей при их последующем аэрогенном заражении возбудителем [32].

В дальнейших исследованиях для праймирования исследовали применение ESAT6 антигена – 85B белка *M. tuberculosis*. Для бустирования использовался рекомбинант MVA, экспрессирующий на высоком уровне 85A, 85B, ESAT6, HSP60, Mtb39 антигены *M. tuberculosis* с IL-15 в качестве молекулярного адъюванта. Было показано, что такая стратегия вакцинации индуцирует умеренный, но длительный иммунный ответ и иммунную память у мышей, по крайней мере, в течение всего срока наблюдения (18 мес).

Таким образом, результаты клинических испытаний свидетельствуют, что штамм MVA вируса вакцины может быть использован как вектор для создания вакцин против туберкулеза. Клинические испытания вакцины MVA85A, содержащей иммунодоминантный ген белка 85A возбудителя туберкулеза, использованной для бустерной иммунизации при проведении праймирования вакциной BCG, показали, что вакцина безопасна как для здоровых волонтеров, так и больных СПИДом и с латентной формой туберкулеза, а также подростков и детей. Ее применение при подкожном, внутримышечном и аэрогенном способах инфицирования в различных дозах не вызывало тяжелых побочных реакций.

Вакцина индуцировала образование CD4⁺ Т-клеточного иммунного ответа, а при больших дозах введения и CD8⁺ Т-иммунного ответа. Однако оценка защитной эффективности показала его недостаточность против заражения туберкулезом. Видимо, иммунный ответ, индуцированный только на один из 6 иммунодоминантных антигенов возбудителя туберкулеза, не обеспечивает эффективную защиту от этого заболевания. Поэтому проводятся исследования по созданию и оценке других рекомбинантных штаммов MVA, содержащих все иммунодоминантные антигены этого возбудителя.

Литература/References

1. Tuberculosis (Edinb). 2004;84(1-2):93-101.
2. Ndiaye BP, Thieneman F, Ota M, Landry BS, Camara M, Dieye S, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in healthy adults infected with HIV-1: a randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Mar;3(3):190-200. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00037-5
3. Griffiths KL, Pathan AA, Minassian AM, Sander CR, Beveridge NER, Hill AVS. Th1/Th17 Cell induction and corresponding reduction in ATP consumption following vaccination with the novel Mycobacterium tuberculosis vaccine MVA85A. *PLoS One*. 2011;6(8):e23463. DOI: 10.1371/journal.pone.0023463.
4. Betts G, Poyntz H, Stylianou E, Reyes-Sandoval A, Cottingham M, Hill A, et al. Optimising Immunogenicity with Viral Vectors: Mixing MVA and HAdV-5 Expressing the Mycobacterial Antigen Ag85A in a Single Injection. *PLoS One*. 2012;7(12):e50447. doi: 10.1371/journal.pone.0050447
5. Glaziou P, Floyd K, Raviglione M. Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2009 Dec;30(4):621-36, vii. DOI: 10.1016/j.ccm.2009.08.017
6. Global tuberculosis control – epidemiology, strategy, financing. WHO/HTM/TB/WHO, Geneva, Switzerland, 2009, 411.
7. Rabinovich NR, Mcennes P, Klein DK, Hall BF. Vaccine Technologies: view to the future. *Science*. 1994;265(5177):1401-4.
8. Brennan MJ, Stoun MR, Evans T. A rational vaccine pipeline for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 Dec;16(12):1566-73. DOI: 10.5588/ijtld.12.0569

9. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Aug;79(16):4927-31
10. Machett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Dec;79(23):7415-9.
11. Pfeleiderer M, Falkner FG, Dorner F. A novel vaccinia virus expression system allowing of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts. *J Gen Virol*. 1995 Dec;76 (Pt 12):2957-62. DOI: 10.1099/0022-1317-76-12-2957
12. Smith JZ, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. *Gene*. 1983 Nov;25(1):21-8.
13. Bournsnel ME, Foulds IJ, Campbell JI, Binns MM. Non-essential genes in the vaccinia virus Hindm K. fragment; a gene related to serine protease inhibitors and a gene related to the 37K vaccinia virus major envelope antigen. *J Gen Virol*. 1988 Dec;69 (Pt 12):2995-3003.
14. Guliane JC, Saiag P, Wechsler J, Lescs MC, Roujeau JC. Vaccinia from recombinant virus expressing HIV genes. *Lancet*. 1991 Apr 27;337(8748):1034-5.
15. Antoine J, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FJ. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. 1998 May 10;244(2):365-96. DOI: 10.1006/viro.1998.9123
16. Baur K1, Brinkmann K, Schweneker M, Pätzold J, Meisinger-Henschel C, Hermann J, et al. Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus Ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses. *J J Virol*. 2010 Sep;84(17):8743-52. DOI: 10.1128/JVI.00604-10
17. Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based Tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 May;17(5):793-801. DOI: 10.1128/CVI.00006-10.
18. Beveridge NE, Price DA, Casuzza JP, Pathan AA, Sander TE, Asher TE, et al. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37(11):3089-100. DOI: 10.1002/eji.200737504
19. Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacilli Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1602-9.
20. McShane H, Pathan AA, Sander CR, Kearing SM, Gilbert SC. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1240-4. DOI: 10.1038/nm1128
21. Hopkins R, Bridgeman A, Joseph J, Gilbert SC, McShane H, Hanke T. Dual neonate vaccine platform against HIV-1 and M. tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(5):e20067. DOI: 10.1371/journal.pone.0020067
22. Hawkrigde T, Scriba JT, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):544-52. DOI: 10.1086/590185.
23. Meyer J, Harris SA, Satti I, Poulton ID, Poyntz HC, Tanner R, et al. Comparing the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine MVA85A administered by intramuscular and intradermal delivery. *Vaccine*. 2013 Feb 4;31(7):1026-33. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.042.
24. Gherardi MM, Esteban M. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol*. 2005 Nov;86(Pt 11):2925-36. DOI: 10.1099/vir.0.81181-0
25. Satti J, Meyer SA, Harris Z-R, Thomas M, Griffiths K, Antrobus RD, et al. Safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine MVA85A delivered by aerosol in BCG-vaccinated healthy adults: a phase 1, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):939-46. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70845-X

26. Sander CR, Pathan AA, Beveridge NE, Poulton I, Minassian A, Alder N, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A. In Mycobacterium tuberculosis-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Apr 15;179(8):724-33. DOI: 10.1164/rccm.200809-14860C
27. Scriba JT, Tameris M, Smit E, van der Merwe L, Hughes EJ, Kadiga B, et al. A phase II trial of the new Tuberculosis vaccine, MVA85A, in HIV- and/or Mycobacterium tuberculosis-infected adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Apr 1;185(7):769-78. DOI: 10.1164/rccm.201108-15480C.
28. Scriba JT, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Isaacs F, et al. MVA85A, a novel TB vaccine, is safe in adolescents and children, and induces complex subset of polyfunctional CD4+ T cell. *Eur J Immunol.* 2010 Jan;40(1): 279-90. DOI: 10.1002/eji.200939754
29. Scriba JT, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Mauff K, et al. Dose-finding study of the novel tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy BCG-vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2011 Jun 15;203(12):1832-43. DOI: 10.1093/infdis/jir195
30. Tameris MD, Hathehl M, Landry BS, Scriba JT, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2013 Mar 23;381(9871):1021-8.
31. Matsumiya M, Stylianou E, Griffiths K, Lang Z, Meyer J, Harris SA, et al. Roles for treg expansion and HMGB1 signaling through the TLR1-2-6 axis in determining the magnitude of the antigen-specific immune response to MVA85A. *PLoS One.* 2013 Jul 3;8(7):e67922. DOI: 10.1371/journal.pone.0067922.
32. Perera Pin-Yu, Derrick SC, Kolibab K, Momoi F, Yamamoto M, Morris SL, et al. A Multi-valent vaccinia virus-based Tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted with interleukin-15 induces robust immune responses in mice. *Vaccine.* 2009 Mar 26;27(15):2121-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.132

Информация о соавторах:

Павельев Дмитрий Игоревич, научный сотрудник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Стовба Людмила Федоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Писцов Михаил Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Лебедев Виталий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации;
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about co-authors:

Dmitry I. Pavelev, researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Luydmila F. Stovba, PhD (Biology), senior researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Mikhail N. Pistcov, PhD (Biology), senior researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

Vitaly N. Lebedev, Doctor of Science (Biology), professor, researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mil.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Вспышка кишечной инфекции в Норвегии

Органы здравоохранения сообщают о вспышке O157: H7 *E. coli*. С начала июня заболели 6 человек. Норвежский институт общественного здравоохранения совместно с муниципальной службой здравоохранения и Норвежским управлением безопасности пищевых продуктов и Ветеринарным институтом выясняют, был ли у пациентов общий источник инфекции. Проводятся интервью с пациентами и отбираются пробы для анализа из домов.

Norway reports *E. coli* outbreak: Investigation ongoing – *Outbreak News Today [WWW Document]*, n.d.
URL <http://outbreaknewstoday.com/norway-reports-e-coli-outbreak-investigation-ongoing-79208/>.

Антибиотикоустойчивая *Klebsiella pneumoniae* зарегистрирована у путешественников на Канарские острова

Сообщается, что группа европейских туристов, возвращающихся с острова Гран-Канария, перенесли или были инфицированы карбапенемазой (OXA-48), производящей *Klebsiella pneumoniae* ST392. По данным ECDC Rapid Risk Assessment, группа европейских туристов, вернувшихся с острова Гран-Канария, были заражены *Klebsiella pneumoniae* ST392 с карбапенемазой (OXA-48).

Europe: Drug resistant *Klebsiella pneumoniae* reported in travelers to the Canary Islands – *Outbreak News Today [WWW Document]*, n.d. URL <http://outbreaknewstoday.com/europe-drug-resistant-klebsiella-pneumoniae-reported-travelers-canary-islands-14349/>.