

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 615.371:578.832.11.012

Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М.

ВЫСОКОРЕПРОДУКТИВНЫЕ АТТЕНУИРОВАННЫЕ РЕАССОРТАНТЫ H2N2 И H7N9 НА ОСНОВЕ ДОНОРА A/HONGKONG/1/68/162/35

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

На основе созданного в НИИ гриппа штамма вируса гриппа A/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2), обладающего свойствами аттенуации и высокой репродуктивности, получены реассортантные штаммы, содержащие поверхностные антигены вирусов гриппа А потенциально пандемических вирусов A/H2N2 и A/H7N9. Высокая репродуктивная активность реассортантных штаммов и иммуногенность живой и инактивированной гриппозных вакцин, полученных на их основе, определяют возможность использования их в качестве вакцинных штаммов при создании живых и инактивированных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Ключевые слова: *вирус гриппа; вирусные реассортанты; донор; живая гриппозная вакцина; инактивированная гриппозная вакцина.*

Для цитирования: Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М. Высокопродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 и H7N9 на основе донора A/Гонконг/1/68/162/35. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(6): 257-262.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-257-262>

Vidyaeva I.G., Potapchuk M.V., Repko I.A., Petrov S.V., Tsybalova L.M.

HIGHLY REPRODUCTIVE ATTENUATED H2N2 AND H7N9 REASSORTANTS ON THE BASIS OF A/HONG KONG/1/68/162/35 DONOR VIRUS

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Reassortants with surface antigens from potentially pandemic A/H2N2 and A/H7N9 influenza viruses were created on the basis of attenuated and highly reproductive A/Hong Kong/1/68/162/35(H3N2) donor virus obtained in the Research Institute of Influenza. High reproductive activity of reassortant viruses and immunogenicity of live and inactivated influenza vaccines based on these viruses indicate the possibility to use obtained reassortants for production of live and inactivated vaccines against potentially pandemic influenza A viruses.

Key words: *influenza virus; virus reassortants; donor strain; live influenza vaccine; inactivated influenza vaccine.*

For citation: Vidyaeva I.G., Potapchuk M.V., Repko I.A., Petrov S.V., Tsybalova L.M. Highly reproductive attenuated H2N2 and H7N9 reassortants on the basis of A/Hong Kong/1/68/162/35 donor virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(6): 257-262. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-257-262>

For correspondence: Inna G. Vidyaeva, Candidate of Medical Sciences, Senior research scientist, Laboratory of influenza vaccines, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: inessa2775@inbox.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07 April 2016
Accepted 24 May 2016

Введение

Пандемия «азиатского» гриппа 1957—1958 г., вызванная вирусом гриппа А подтипа H2N2, унесла жизни около 2 млн человек. К 1968 г. подтип H2N2 перестал циркулировать среди людей и сохранился в популяции птиц. В настоящее время вирус циркулирует среди птиц и рассматривается как один из наиболее вероятных возбудителей новой пандемии, так как люди моложе 50 лет не обладают иммунитетом к этому подтипу. В 2014 г. в журнале *Virology* группой авторов опубликовано исследование 22 вирусов подтипа A/H2N2, изолированных от диких и домашних птиц, которое показало, что все они имеют низкий уровень генетической и антигенной из-

менчивости. Большая часть изолятов проявила антигенное сходство с пандемическим вирусом A/Сингапур/1/57 (H2N2), что предполагает возможность использования вирусов, выделенных в период пандемии 1957 г., для разработки вакцин [1]. В работе С. Pappas и соавт. [2] были проанализированы возможности передачи млекопитающим (хорькам) птичьих вирусов подтипа H2 (A/H2N2 и A/H2N3). Генетический анализ гемагглютинина (HA), полученного из носовых смывов хорьков, показал наличие мутаций в первой субъединице (HA1), включая рецепторспецифичные адаптивные мутации Gln226Leu, определяющие человеческий тип рецепторов α -2-6, что указывает на возможность адаптации H2-вирусов к

Для корреспонденции: Видяева Инна Геннадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: inessa2775@inbox.ru

млекопитающим и их потенциальную опасность для человека [2].

Другими потенциально пандемическими вирусами гриппа являются штаммы подтипа Н7. В 2003 г. зафиксирована наиболее масштабная вспышка заболевания птиц, вызванного высокопатогенным вирусом А/Н7N7 в Нидерландах, во время которой птичьим вирусом были заражены 89 человек, один со смертельным исходом [3]. Кроме того, периодически регистрируются вспышки низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н7, сопровождающиеся инфицированием людей. До недавнего времени не выявлялось случаев инфицирования вирусом А/Н7N9 птиц, животных или людей. Первые сообщения об инфицировании людей этим штаммом поступили в ВОЗ 31 марта 2013 г. из Китая. К настоящему времени зарегистрировано 602 случая инфицирования людей вирусом А/Н7N9 — большинство в континентальном Китае [4]. Характерной особенностью нового штамма стало большое количество случаев со смертельным исходом среди заболевших людей (примерно 36%). Результаты нескольких исследований указывают на способность вирусов А/Н7N9 активно размножаться в органах мышей, хорьков и приматов, а также в клетках, выстилающих эпителий дыхательных путей человека [5, 6]. Эти явления обусловили актуальность получения вакцинных штаммов против вируса А/Н7N9.

С целью получить вакцинный реассортант на основе эпидемического вируса А/Н2N2, который был бы эффективен против вероятного возбудителя пандемии, мы проанализировали изменчивость первой субъединицы НА Н2 на протяжении 10 лет циркуляции вирусов А/Н2N2 и выбрали 2 штамма как основу для создания вакцины: штамм А/Япония/305/57 (Н2N2), идентичный по последовательности аминокислотных остатков НА1 эталонному штамму А/Сингапур/1/57, и А/Калифорния/1/66 (Н2N2), филогенетически наиболее удаленный от эталонного штамма и отражающий состояние вируса на момент его элиминации из человеческой популяции (рис. 1).

В качестве донора внутренних генов при получении реассортантов на основе вирусов А/Н2N2 и А/Н7N9 мы использовали разработанный в НИИ гриппа универсальный донор А/Гонконг/1/68/162/35 (Н3N2) [7, 8], который ориентирован на получение

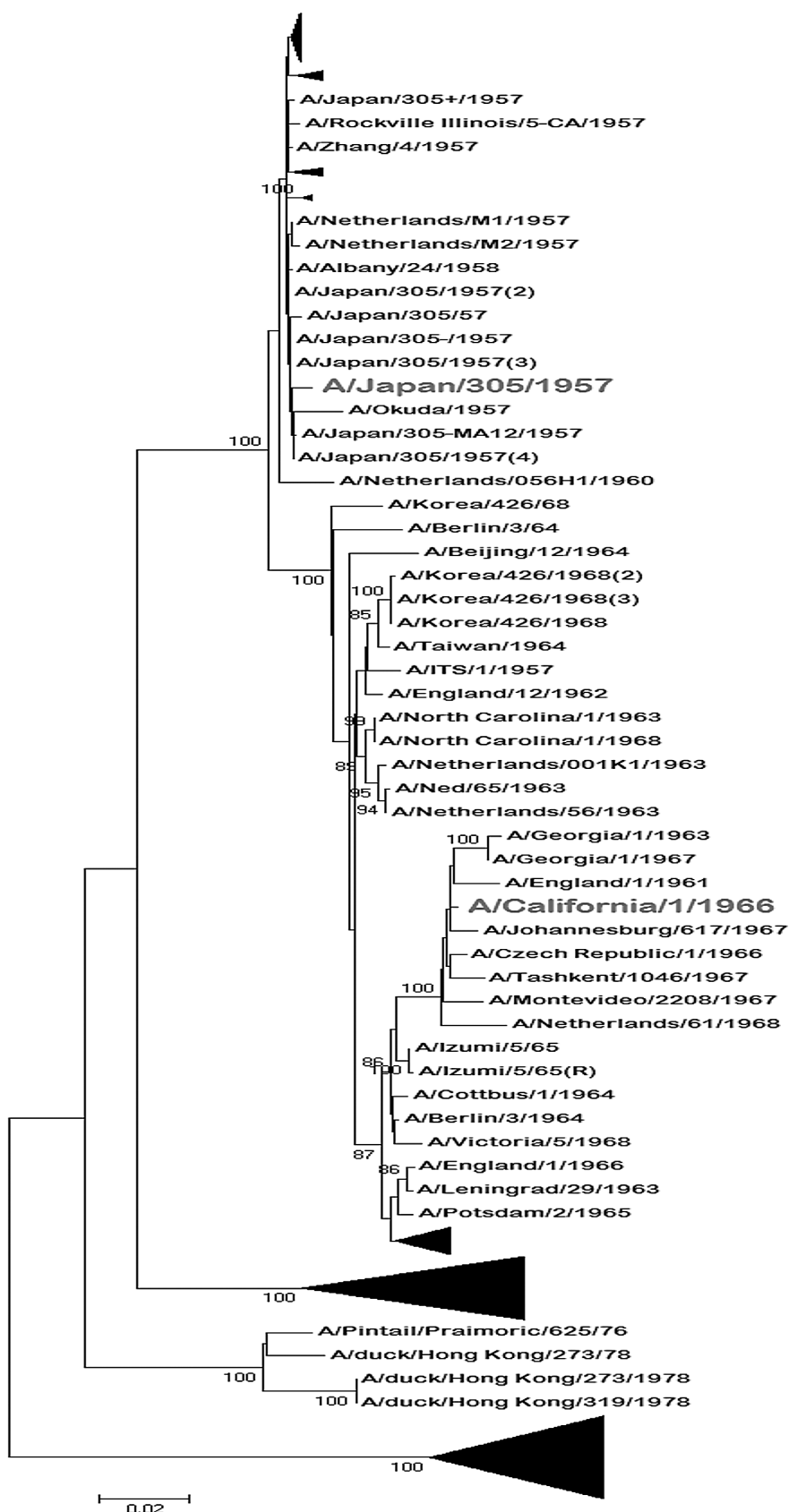


Рис. 1. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гемагглютининов подтипов Н2 вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 1957 по 1966 г.

реассортантных штаммов как для живой (ЖГВ), так и для инактивированной (ИГВ) гриппозных вакцин. Ранее нами было показано, что донор А/Гонконг/1/68/162/35 имеет высокую репродуктивную (9—9,5 lg ЭИД₅₀) и гемагглютинирующую (1:1024—1:2048) активность, а также маркеры аттенуации к человеку ts-, са-фенотип. Реассортанты на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35 наследуют ts-, са-фенотип и приобретают более высокую инфекционную, гемагглютинирующую и репродуктивную активность. При этом они безопасны и нетоксичны для лабораторных животных [8—10].

Цель работы — получение реассортантов на основе вирусов гриппа А/Н2N2 и А/Н7N9 и донора внутренних генов А/Гонконг/1/68/162/35 в качестве кандидатных вакцинных штаммов, исследование их репродуктивных свойств и иммуногенности.

Материал и методы

Вирусы. А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) — А/ГК/ХА — холодоадаптированный штамм — донор аттенуации и высокой репродуктивной активности (получен в лаборатории гриппозных вакцин ФБГУ «НИИ гриппа» [патент № 2511431]. А/Shanghai/2/2013 (H7N9) — PR8-IDCDC-RG32A — реассортант, полученный методом обратной генетики на основе вируса гриппа А/Шанхай/2/2013 (H7N9) и донора А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (Центр по контролю и профилактике инфекционных болезней (CDC), Атланта, США). А/Калифорния/1/66 (H2N2) — эпидемический штамм, полученный из ФГБУ «НИИ-ЭМ» РАН. А/Япония/305/57 (H2N2) — эпидемический штамм из коллекции вирусов ФГБУ «НИИ гриппа».

Реассортацию проводили классическим методом в 10—11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [11]. Состав генома реассортантов определяли методом ОТ-ПЦР и рестрикционного анализа с использованием специально подобранных праймеров и рестриктаз. Принадлежность нейраминидазы определяли методом ОТ-ПЦР с типоспецифичными праймерами к различным субтипам. Принадлежность НА определяли в РТГА [12].

Подготовка вакцинных препаратов. Для получения ЖГВ накопленный вирусный материал реассортантных вирусов разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ) до концентрации 6,5 lg ЭИД₅₀/мл. Препараты ИГВ получали методом изопикнического центрифугирования

в градиенте плотности сахарозы. Инактивацию проводили 0,02% формалином. Содержание НА в вакцинных препаратах оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией. Препараты ИГВ содержали 15 мкг НА на дозу (0,5 мл). В качестве адьюванта использовали гидроксид алюминия — 500 мкг на дозу.

Температурочувствительность и холодоадаптированность вирусов оценивали по результатам их параллельного титрования в РКЭ при оптимальной (32 °С), повышенной (39 °С) и пониженной (26 °С) температуре и выражали в виде разницы показателей инфекционной активности в lg ЭИД₅₀/0,2 мл (соответственно RCT₃₉ и RCT₂₆).

Иммунизация животных. Мышей линии Balb/c массой 18—20 г иммунизировали ЖГВ двукратно интраназально в дозе 6,5 lg ЭИД₅₀. Препараты ИГВ вводили внутримышечно двукратно с интервалом 2 нед в дозе 15 мкг НА на мыш. Сыворотки крови забирали у 5 мышей каждой группы на 14-й день после 2-й иммунизации. Контрольные группы иммунизировали ФСБ.

Серологические исследования. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили микрометодом, реакцию нейтрализации (РН) выполняли в культуре клеток MDCK [13].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Все работы с животными проводили согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [14].

Результаты

Методом прямой генетической реассортации были получены реассортанты RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2), RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) и RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9), заимствовавшие поверхностные антигены от потенциально пандемических штаммов, а гены внутренних белков — от штамма-донора А/ГК/ХА, что подтверждается результатами ОТ-ПЦР-рестрикционного анализа (рис. 2).

Реассортанты, полученные на основе донора А/ГК/ХА, показали высокую репродуктивную активность в РКЭ. Гемагглютинирующая активность реассортанта RA-36

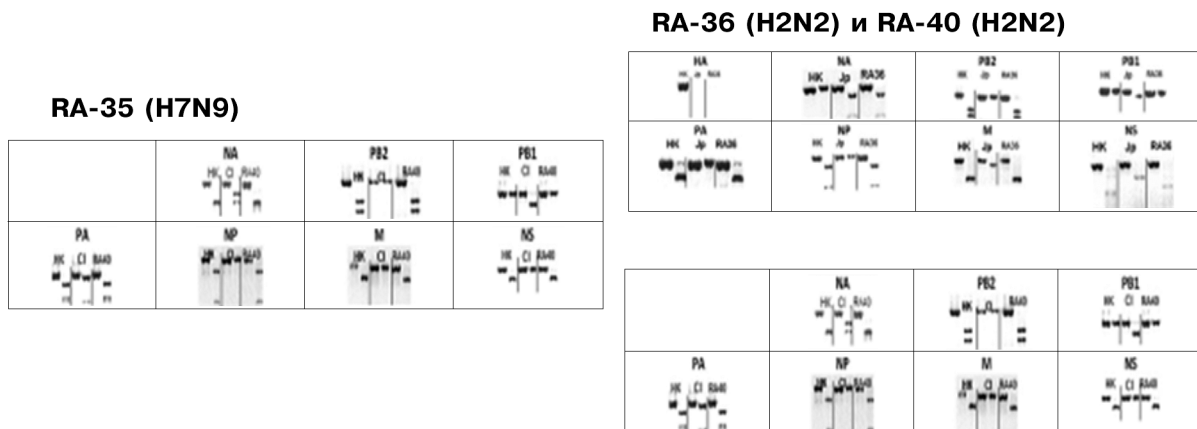


Рис. 2. Геномный состав реассортантов, полученных на основе донора внутренних генов А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2). RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2), RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) и RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9).

Таблица 1

Биологические свойства реассортантов и родительских вирусов

Штамм	Инфекционная активность при температуре, lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл			RCT _{26°} фено-тип	RCT _{39°} фено-тип	ГАЕ/ ₅₀ мл
	26 °С	32 °С	39 °С			
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) — PR8-IDCDC-RG32A	<0,5	7,66	6,0	7,1 non-ca-	1,66 non-ts-	128—256
RA-35 A/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9)	8,33	9,5	<0,5	1,2 ca-	9,0 ts-	512—1024
A/Япония/305/57	5,0	8,5	5,5	3,5 non-ca-	3,0 non-ts-	128—256
RA-36 (A/Япония/ГК/6:2 H2N2)	6,75	9,5	2,5	2,75 ca-	7,0 ts-	1024
A/Калифорния/1/66	2,75	8,5	2,0	5,75 non-ca-	6,5 ts-	64—128
RA-40 (A/Калифорния/ГК/6:2 H2N2)	6,75	9,5	<0,5	2,75 ca-	9,0 ts-	1024
A/ГК/1/68/162/35	8,5—9,5	9,0—10,0	1,5	0,5 ca-	7,5 ts-	1024—2048

Таблица 2

Антигенная специфичность реассортанта A/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) в РТГА

Сыворотки, титр в РТГА	Тестируемые вирусы	
	A/Шанхай/2/2013 (H7N9)	A/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9)
A(H1N1)pdm09 (160)	<10	<10
A(H1N1) (160)	<10	<10
A(H2N2) (160)	<10	<10
A(H3N2) (320)	<10	<10
B (320)	<10	<10
A(H7N9) (640)	640	640
A(H7N3) (640)	320	320

составила 1:1024 ГАЕ, RA-40 — 1:2048 ГАЕ, RA-35 — 1:1024, что соответствует повышению титра вируса в 4—8 раз по сравнению с исходными вариантами для всех штаммов. Инфекционная активность в РКЭ возросла на 1—2 lg ЭИД₅₀/0,2 мл и достигла 9,5 lg ЭИД₅₀/0,2 мл (табл. 1).

Все полученные реассортанты наследовали от штамма-донора A/Гонконг/1/68/162/35 ts-, ca-фенотип — спо-

собность хорошо репродуцироваться при пониженной температуре и почти полную потерю способности к репродукции при повышенной температуре (см. табл. 1). Для оценки генетической стабильности реассортантных вакцинных штаммов их 5-кратно пассировали при 32°С в системе РКЭ. Все вирусы после пассирования сохранили фенотипические характеристики, присущие исходным вариантам. Степень температурочувствительности и холодоадаптированности, а также уровень репродукции не изменялись при 5-кратном пассировании. Таким образом, реассортантные штаммы удовлетворяют требованиям температурочувствительности и холодовой адаптации, предъявляемым к вакцинным штаммам для ЖГВ, и высокой репродуктивности для ИГВ.

При исследовании антигенной специфичности полученных реассортантов в РТГА было показано, что все они не реагировали с гетерологичными типоспецифическими сыворотками. Реассортант A/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) реагировал со специфическими иммунными крысиными сыворотками типа A/H7N9 и A/H7N3 (табл. 2). При исследовании специфичности вирусов H2N2 было выявлено наличие перекрестного антигенного взаимодействия (табл. 3), что соответствует данным литературы [15] и результатам, полученным в наших исследованиях иммунных сывороток мышей (рис. 3, 4).

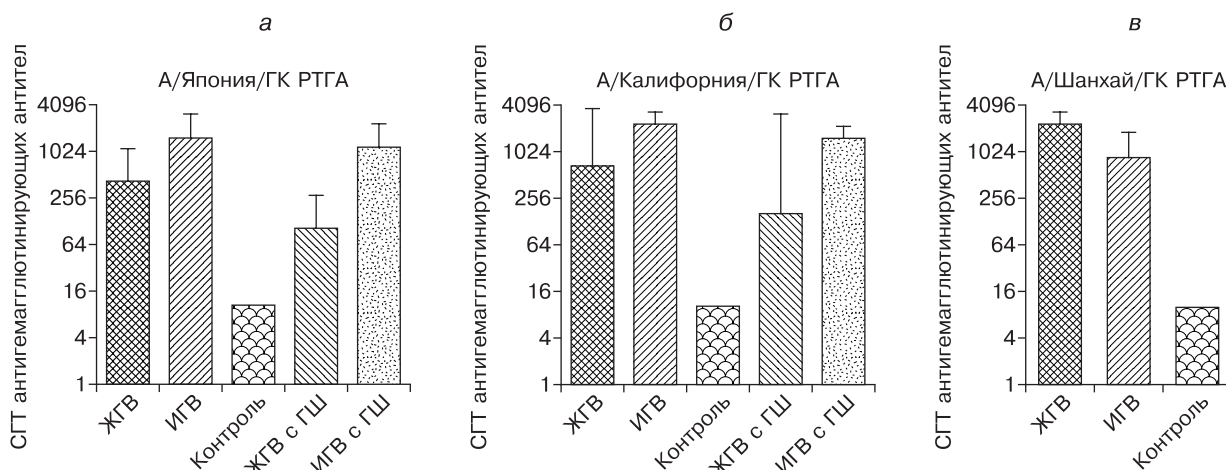


Рис. 3. Титры геммагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных ЖГВ и ИГВ на основе вирусов H2N2 (а, б) и H7N9 (в).

Здесь и на рис. 4: ГШ — гетерологичный штамм.

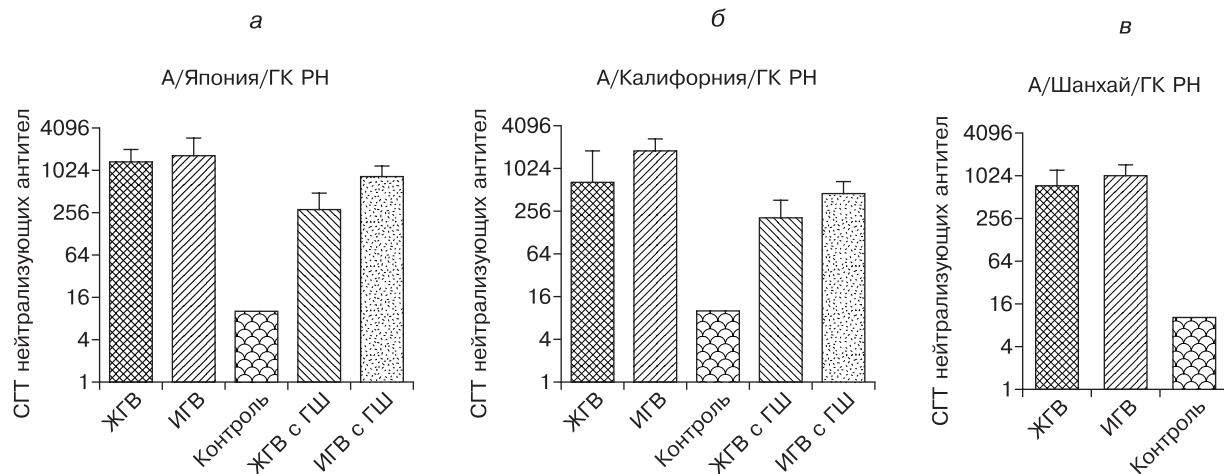


Рис. 4. Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных ЖГВ и ИГВ на основе вирусов H2N2 (а, б) и H7N9 (в).

Препараты ЖГВ и ИГВ, подготовленные на основе реассортантных штаммов, использовали для иммунизации мышей и исследования иммуногенности. Данные по содержанию антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител к вирусам гриппа в сыворотках крови мышей, иммунизированных препаратами ЖГВ и ИГВ реассортантных штаммов (см. рис. 3, 4), демонстрируют достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител по сравнению с контрольными животными во всех группах.

После иммунизации ИГВ на основе реассортантных вирусов А/Калифорния/ГК/6:2 (H2N2), А/Япония/ГК/6:2 (H2N2) и А/Шанхай/ГК/6:2 (H7N9) в сыворотках мышей были выявлены антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела в титрах, достаточных для формирования защитного иммунитета (СГТ в РТГА от 403 до 1940,1, в РН — от 640 до 1940,1) (см. рис. 3, 4). В случае штаммов H2N2 в сыворотках мышей выявлялись антигемагглютинирующие и нейтрализующие антитела как к штамму, на основе которого были получены вакцины, так и к гетерологичному штамму того же подтипа, что позволяет предполагать широкий спектр действия вакцин в рамках подтипа вируса гриппа А/H2N2.

Заключение

Работы по созданию вакцин против пандемических вирусов гриппа ведутся во всем мире, ряд вакцин прошли или проходят испытания на приматах и людях. Это в

основном вакцины, полученные на основе штаммов вируса гриппа А/H2N2, циркулировавших в человеческой популяции с 1957 по 1968 г., или на основе современных штаммов животного происхождения [16— 19]. Аналогичные работы ведутся и в отношении вируса гриппа А/ H7N9 [15, 20, 21]. Во всех случаях проводились исследования либо живых, либо инактивированных вакцин. В нашем исследовании одни и те же штаммы использовались для получения и живой, и инактивированной вакцины и в обоих случаях показали аттенуированность, высокую репродуктивность, а препараты, полученные на их основе, — высокую иммуногенность. Можно заключить, что все исследованные штаммы обладают набором признаков, необходимых вакцинному штамму, — структурой генома, антигенной специфичностью НА соответствующих вирусов «дикого» типа, хорошей адаптацией к культивированию при пониженной температуре, температурочувствительностью, а также высоким уровнем репродукции в куриных эмбрионах. Высокие уровни титров гемагглютинирующих и нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных позволяют рассматривать полученные реассортанты RA-35 (А/Шанхай/ГК/6:2 H7N9), RA-36 (А/Япония/ГК/6:2 H2N2) и RA-40 (А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2) в качестве кандидатных вакцинных и производственных штаммов в условиях предпандемической ситуации для производства как инактивированной, так и живой гриппозной вакцины после исследований, посвященных

Таблица 3

Антигенная специфичность вирусов H2N2 в РТГА

Сыворотки, титр в РТГВ	Тестируемые вирусы					
	А/Калифорния/1/66 H2N2	А/Япония/305/57 H2N2	А/Токио/3/67 H2N2	А/Сингапур/1/57 H2N2	А/Япония/ГК/6:2 H2N2	А/Калифорния/ГК/6:2 H2N2
А(H1N1)pdm09 (160)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А(H1N1) (160)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А(H3N2) (320)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
В (320)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
А/Калифорния/1/66 H2N2 (512)	512	256	128	256	256	512
А/Япония/305/57 H2N2 (512)	32	512	16	128	512	128

специфической безопасности штаммов и протективно-му действию препаратов, полученных на их основе. В настоящее время проводится цикл исследований полученных нами реассортантов в данном направлении.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—6, 15—21 см. REFERENCES)

7. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Репко И.А., Потапчук М.В., Сергеева М.В., Киселев О.И. Вирус гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 — универсальный донор внутренних генов для вакцинных и производственных штаммов. Патент РФ № 2511431; 2011.
8. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потапчук М.В., Репко И.А., Коротков А.В., Сергеева М.В. и др. Характеристика холодоадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(6): 13—7.
9. Потапчук М.В., Репко И.А., Сергеева М.В., Коротков А.В., Комиссаров А.Б., Сандыбаев Н.Т. и др. Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/HongKong/1/68/162/35(H3N2). *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(6): 42—6.
10. Сергеева М.В. Сравнительное исследование специфической активности живой и инактивированной вакцин против потенциально пандемического гриппа на морских свинках. *Медицинский академический журнал.* 2012; 12(4): 52—4.
11. Александрова Г.И. Применение метода генетической реассортации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа. *Вопросы вирусологии.* 1997; 42(4): 387—95.
12. МУ 3.3.2.1758—03. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. М.; 2003.
13. Соминина А.А., Кривицкая В.З., Войцеховская Е.М., Медведева Н.А., Липина Н.В., Потапенко Л.Б. *Практические рекомендации по лабораторной диагностике вирусных инфекций.* СПб.; 2005.
14. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Биоэтический кодекс). Available at: <http://www.msu.ru/bioetika/recomend.doc>
15. attachment to the respiratory tract of five animal models. *J. Virol.* 2014; 88(8): 4595—9.
16. Tsybalova L.M., Gorev N.E., Repko I.A., Potapchuk M.V., Sergeeva M.V., Kiselev O.I. Influenza virus strain A/Hong Kong/1/68/162/35 — universal donor of internal genes for reassortants and reassortant strains. Patent RF N 2511431; 2011. (in Russian)
17. Tsybalova L.M., Gorev N.E., Potapchuk M.V., Repko I.A., Korotkov A.V., Sergeeva M.V. et al. Characteristics of cold-adapted strain of influenza A/Hong Kong/1/68/162/35 as a potential donor of attenuation and high fertility. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(6): 13—7. (in Russian)
18. Potapchuk M.V., Repko I.A., Sergeeva M.V., Korotkov A.V., Komissarov A.B., Sandybaev N.T. et al. Characteristics of reassortant influenza virus strains based on new donor A/HongKong/1/68/162/35 (H3N2). *Voprosy virusologii.* 2012; 57(6): 42—6. (in Russian)
19. Sergeeva M.V. A comparative study of the specific activity of live and inactivated vaccines against potential pandemic influenza in guinea pigs. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal.* 2012; 12(4): 52—4. (in Russian)
20. Aleksandrova G.I. Use of a method of a genetic reassortation for receiving vaccine influenza strains. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(4): 387—95. (in Russian)
21. Methodical instructions 3.3.2.1758—03. Methods for determination of parameters of quality of immunobiological drugs for the prevention and diagnosis of influenza. Moscow; 2003. (in Russian)
22. Somnina A.A., Krivitskaya V.Z., Voytsekhovskaya E.M., Medvedeva N.A., Lipina N.V., Potapenko L.B. et al. *Practical Recommendations for the Laboratory Diagnosis of Viral Infections [Prakticheskie rekomendatsii po laboratornoy diagnostike virusnykh infektsiy].* St. Petersburg; 2005. (in Russian)
23. International recommendations for biomedical research involving animals (Bioethics Code). Available at: <http://www.msu.ru/bioetika/recomend.doc> (in Russian)
24. Duan Y., Gu H., Chen R., Zhao Z., Zhang L., Xing L. et al. Response of mice and ferrets to a monovalent influenza A (H7N9) split vaccine. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99322.
25. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Petukhova G. et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(4): 970—82.
26. Broadbent A.J., Santos C.P., Paskel M., Matsuoka Y., Lu J., Chen Z. et al. Replication of live attenuated cold-adapted H2N2 influenza virus vaccine candidates in non human primates. *Vaccine.* 2015; 33(1): 193—200.
27. Chen G.L., Lamirande E.W., Cheng X., Torres-Velez F., Orandle M., Jin H. et al. Evaluation of three live attenuated H2 pandemic influenza vaccine candidates in mice and ferrets. *J. Virol.* 2014; 88(5): 2867—76.
28. Isakova-Sivak I., de Jonge J., Smolnogina T., Rekstin A., van Amerongen G., van Dijken H. et al. Development and Pre-Clinical Evaluation of Two LAIV Strains against Potentially Pandemic H2N2 Influenza Virus. *PLoS One.* 2014; 9(7): e102339.
29. To K.K., Zhang A.J., Chan A.S., Li C., Cai J.P., Lau C.C. et al. Recombinant influenza A virus hemagglutinin HA2 subunit protects mice against influenza A(H7N9) virus infection. *Arch. Virol.* 2015; 160(3): 777—86.
30. Kong H., Zhang Q., Gu C., Shi J., Deng G., Ma S. et al. A live attenuated vaccine prevents replication and transmission of H7N9 virus in mammals. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11233.

REFERENCES

1. Jones J.C., Baranovich T., Marathe B.M., Danner A.F., Seiler J.P., Franks J. et al. Risk assessment of H2N2 influenza viruses from the avian reservoir. *J. Virol.* 2014; 88(2): 1175—88.
2. Pappas C., Yang H., Carney P.J., Pearce M.B., Katz J.M., Stevens J. et al. Assessment of transmission, pathogenesis and adaptation of H2 subtype influenza viruses in ferrets. *Virology.* 2015; 477: 61—71.
3. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., van der Nat H., Vennema H. et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004; 363(9409): 587—93.
4. World Health Organization. Available at: <http://www.euro.who.int>
5. Bao L., Xu L., Zhu H., Deng W., Chen T., Lv Q. et al. Transmission of H7N9 influenza virus in mice by different infective routes. *Virol. J.* 2014; 11: 185.
6. Siegers J.Y., Short K.R., Leijten L.M., de Graaf M., Spronken M.I., Schrauwen E.J. et al. Novel avian-origin influenza A (H7N9) virus

Поступила 07.04.16

Принята в печать 24.05.16