

Ю.З. Гендон, С.Г. Маркушин, Т.М. Цфасман, И.И. Акопова, Н.К. Ахматова, И.Б. Коптяева

## Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

---

Путем пассажей при пониженной температуре эпидемических штаммов вируса гриппа А/Краснодар/101/59 (H2N2) и В/Виктория/2/87 получены холодоадаптированные (ха) штаммы этих вирусов — А/Краснодар/35 и В/Виктория/63, обладающие ts и са-фенотипами, сниженной способностью размножаться в носовых ходах и легких мышей и высокой защитной эффективностью в опытах на мышах. Оба ха-штамма хорошо размножились в куриных эмбрионах и линии клеток MDCK, сохраняя ts- и са-признаки. У ха-штамма А/Краснодар/35 выявлены 13 мутаций в 6 генах, из которых 8 мутаций привели к замене аминокислот. У ха-штамма В/Виктория/63 обнаружены 8 мутаций в 6 генах, из которых 6 привели к замене аминокислот. При интраназальной иммунизации мышей ха-штаммом А/Краснодар/35 наблюдалась транзиторная супрессия образования ряда лимфоцитов при одновременном повышении образования ряда других клеток. Полученные ха-штаммы вируса гриппа могут быть перспективными штаммами-донорами аттенуации для живой гриппозной вакцины.

Ключевые слова: *грипп, живая вакцина, ха-штаммы-доноры*

### New Cold-Adapted Donor Strains for Live Influenza Vaccine

Y. Z. Ghendon, S. G. Markushin, T. M. Tsfasman, I. I. Akopova, N. K. Ahmatova, I. B. Koptiaeva

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Cold-adapted (CA) strains A/Krasnodar/35 and B/Victoria/63 were isolated using passages of A/Krasnodar/101/59 and B/Victoria/2/87 wild type strains at low temperatures. The resulting CA strains possessed TS and CA phenotypes and had a reduced ability to reproduce in mouse lungs and nasal turbinates. They displayed a high protective efficacy in experiments on mice. The two CA strains reproduced well in chick embryos and MDCK cell line without change of TS and CA markers. The CA A/Krasnodar/35 strain during passages at low temperature acquired 13 mutations in the 6 internal genes, 8 of those mutations led to amino acid changes. The CA B/Victoria/63 strain acquired 8 mutations in the internal genes, 6 of which led to amino acid changes. The intranasal vaccination of mice with the CA A/Krasnodar/35 strain led to a transitory suppression of various lymphocyte subpopulations, as well as to an increase in the number of some other cell types. The CA strains in question may be used in the future as attenuation donors for live influenza vaccines.

Key words: *influenza, live influenza vaccine, CA donor strains*

---

В настоящее время для профилактики гриппа используются преимущественно инактивированные гриппозные вакцины, однако в последнее время в ряде стран стали применять холодоадаптированную живую вакцину.

Живая гриппозная вакцина способна индуцировать не только гуморальный, но и местный иммунитет в носоглотке. Кроме того, применение этой вакцины — назального спрея — позволяет более успешно проводить массовую вакцинацию против гриппа, что особенно важно в случаях возникновения гриппозных пандемий.

В настоящее время для изготовления живой холодоадаптированной (ха) гриппозной вакцины в России используют ха-штаммы А/Ленинград/34/17/57 (H2N2) и штамм В/СССР/60/69, а в США — ха-штаммы А/ЭннАрбор/6/60 (H2N2) [16] и В/ЭннАрбор/1/66 [12]. Эти штаммы-доноры аттенуации получены путем пассажей при пониженной температуре и были хорошо изучены по способности размножаться при различных температурах (ts- и са-признаки), а также

по наличию мутаций в геноме этих ха-штаммов [3]. Ха-штаммы вируса гриппа были также получены в Южной Корее, но пока для изготовления живой вакцины не используются [23, 30].

Между тем применяемый в России ха-штамм-донор А/Ленинград/34/17/57 оказался генетически гетерогенным [4], он также обладает повышенной реактогенностью для маленьких детей [1]. Кроме того, живые гриппозные ха-вакцины, применяемые как в России, так и в США, характеризуются очень слабой эффективностью при вакцинации пожилых лиц [27, 29].

Целью настоящего исследования являлось получение новых ха-штаммов — доноров аттенуации вирусов гриппа, изучение их биологических свойств и наличия мутаций в геноме.

### Материалы и методы

*Вирусы.* Для получения ха-штаммов вируса гриппа использовали эпидемические штаммы вирусов, выделенных от людей, заболевших гриппом во время сезон-

ных эпидемий, — штамм А/Краснодар/101/59 (H2N2) и В/Виктория/2/87. В дальнейшем эти штаммы обозначены как А/Кр/дт и В/Вик/дт. Полученные ха-штаммы обозначили как А/Краснодар/101/59/35 и В/Виктория/2/87/63, в дальнейшем — А/Кр/35 и В/Вик/63.

**Определение ts- и са-фенотипов.** При определении ts-фенотипа (неспособности вируса размножаться при повышенной температуре) и са-фенотипа (способности вируса размножаться при пониженной температуре) проводили титрование вируса в куриных эмбрионах и линии клеток MDCK одновременно при оптимальной (34°C), пониженной (26°C) и повышенной (40°C) температуре для вируса гриппа АН2/Н2 и при 34°, 26° и 38°C для штамма вируса гриппа В. Штамм вируса считался обладающим ts-фенотипом, если он был не способен к репродукции при повышенной температуре, но хорошо размножался при оптимальной температуре, а са-фенотипом, если разница в титрах при оптимальной и пониженной температуре инкубации была равна или меньше  $3 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ .

**Размножение вирусов в носоглотке и легких мышей.** Мышей делили на группы (по 5—6 мышей) и заражали интраназально ха-штаммами или вирулентными родительскими штаммами вируса гриппа, вводя по 25 мкл вируса в каждую ноздрю при титре вирусов  $10^{6,0} \text{ЭИД}_{50}/50 \text{ мкл}$ . Через 72 ч после заражения мышей подвергали эвтаназии. Извлекали носовые ходы и легкие, которые гомогенизировали и готовили 10% суспензию, которую центрифугировали при 3000 об/мин и 10-кратными разведениями надосадочной жидкости заражали куриные эмбрионы. Через 48 ч инкубации при 34°C для вируса гриппа А или 72 ч при 32°C для вируса гриппа В определяли титр вируса (оптимальная температура для размножения вирусов гриппа А и В).

**Определение иммуногенности ха-штаммов вируса гриппа.** Мышей иммунизировали интраназально двукратно с интервалом 21 день, вводя в каждую ноздрю по 25 мкл вируса с титром  $10^{5,0} \text{ЭИД}_{50}/50 \text{ мкл}$ . Через 10 дней после второй вакцинации брали кровь, а также легкие и носовые ходы, из которых готовили 10% суспензию и определяли титры антител, задерживающих гемагглютинацию в крови, и титры IgA-антител в суспензии легких и носовых ходов в реакции ИФА.

**Определение защитной эффективности ха-штаммов вируса гриппа.** Мышей вакцинировали интраназально, вводя в каждую ноздрю по 25 мкл ха-штаммов вируса с титром  $10^{5,0} \text{ЭИД}_{50}/50 \text{ мкл}$ . Мышей вакцинировали двукратно с интервалом 21 день и на 10-й день после второй вакцинации им вводили интраназально по 25 мкл заранее оттитрованных на мышках родительских штаммов вируса в количестве 100 летальных доз. Через 2 сут после инфицирования проводили эвтаназию, извлекали легкие, из которых готовили 10% эмульсию, которую центрифугировали и в надосадке определяли титр вируса на куриных эмбрионах.

**Анализ последовательности нуклеотидов в геноме изучаемых штаммов вируса гриппа.** Для секвенирования использовали ПЦР-продукты, очищенные из препаративного геля или непосредственно из ПЦР-смеси. Секвенирование генов, кодирующих внутренние белки вирусов, проводили на автоматическом секвенаторе MegaBACE-500. Мутацию считали достоверной, если ее наличие подтверждали данные, полученные с использованием по крайней мере двух разных праймеров.

**Комплементационно-рекомбинационный тест.** Этот тест для выявления ts-мутаций в отдельных генах ха-штамма вируса гриппа А/Кр/35 выполняли при использовании одноударных ts-мутантов вируса гриппа при Н7Н7 по методике, описанной ранее [14].

**Анализ иммунофенотипа спленоцитов.** Мышам линии СВА массой 10—12 г (10 животных в каждой группе) вводили в каждую ноздрю по 25 мкл вирулентного и ха-штамма А/Краснодар в титре  $10^{6,0} \text{ЭИД}_{50}/\text{мкл}$ . Через 21 день вакцинацию повторяли и через 7 сут после первой и второй вакцинации у мышей извлекали селезенку, которую гомогенизировали, центрифугировали в градиенте плотности фиколлюрографина, собирали интерфазное кольцо, образованное мононуклеарными моноцитами, которые затем отмывали в среде 199. Концентрацию клеток доводили до  $10^5$  в 1 мл. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов проводили по методике, описанной ранее [2]. Статистическую обработку данных выполняли при помощи статистических программ Windows2003/Stat Soft 6.0.

## Результаты и обсуждение

**Получение ха-штаммов вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и их ts- и са-фенотип.** При пассажах на куриных эмбрионах штаммов А/Кр/дт и В/Вик/дт на первых пассажах куриные эмбрионы инфицировали  $10^{2,0} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$  вируса. При последующих пассажах куриные эмбрионы инфицировали аллантоисной жидкостью предыдущего пассажа, разведенной в 10 раз. В опытах с вирусом а/Кр/дт было проведено 5 пассажей при 30°C и 25 пассажей при 26°C на куриных эмбрионах, а затем 5 пассажей при 26°C в линии клеток MDCK (общее число пассажей 35), после чего вирус был трижды клонирован методом бляшек в линии клеток MDCK. Полученный ха-штамм был назван А/Краснодар/101/35/59 (А/Кр/35).

Эпидемический штамм вируса В/Виктория/2/87 прошел на куриных эмбрионах 2 пассажа при 30°C, 3 пассажа при 28°C и 6 пассажей при 26°C, после чего прошел 34 пассажа в линии клеток MDCK при 26°C и затем 18 пассажей при 26°C на куриных эмбрионах. После этого вирус был трижды клонирован методом бляшек в линии клеток MDCK и получил название В/Виктория/2/87/63 (В/ВИК/63).

**Изучение ts- и са-генетических признаков.** После 5 пассажей при 30°C и 15 пассажей при 26°C вирус А/Краснодар приобрел некоторую способность размножаться при 26°C до  $10^{3,0} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ , но еще мог размножаться и при 40°C, хотя титры при этой температуре были значительно ниже, чем у родительского штамма А/Кр/дт. После дополнительных 10 пассажей на куриных эмбрионах вирус полностью утратил способность размножаться при 40°C, но хорошо размножался при 34°C и 26°C ( $10^{5,5} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ ). После дополнительных 5 пассажей в линии клеток MDCK вирус был трижды клонирован методом бляшек в линии клеток MDCK.

При заражении куриных эмбрионов клонированным ха-штаммом А/Кр/35 титры при 34°C составляли  $10^{8,0} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$  (инкубация 2 сут), при 26°C —  $10^{5,5} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$  (инкубация 3 сут) и при 40°C — менее  $10^{1,0} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$  (инкубация 2 сут). В то же время титры вирулентного штамма А/Кр/дт при 40°C составили  $10^{4,5} \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ , а при 26°C вирус не размно-

жался (табл. 1). Таким образом, ха-штамм А/Кр/35 обладал ts- и са-фенотипами. Следует отметить, что этот ха-штамм хорошо размножался в линии клеток MDCK при 32° и 26°С и не размножался при 40°С.

Сравнение штаммов вируса В/Виктория, прошедших 41 пассаж (В/Вик/41) и 63 пассажа (В/Вик/63) показало (см. табл. 1), что штамм В/Вик/41 очень слабо размножался в куриных эмбрионах при 38°С в отличие от родительского штамма В/Вик/дт, однако приобрел некоторую способность размножаться при 26°С. Штамм В/Вик/63, прошедший дополнительно 22 пассажа при пониженной температуре, размножался в куриных эмбрионах при 34°С до титра  $10^{8,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, при 26°С — до  $10^{6,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл и не размножался при 38°С. Вирулентный штамм В/Вик/дт хорошо размножался при 34° и 38°С и очень слабо размножался при 26°С ( $10^{2,8}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл) (см. табл. 1). Таким образом, ха-штамм В/Вик/63 обладал ts- и са-фенотипами. При культивировании в линии клеток MDCK ха-штамм В/Вик/63 размножался при 26°С до таких же титров, как и при 34°С, и не размножался при 38° и 40°С.

*Анализ размножения ха-штаммов вирусов гриппа в носовых ходах и легких мышей.* Полученные данные показали (см. табл. 1), что после интраназального введения мышам ха-штамма А/Кр/35 в дозе  $10^{6,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл на 3-й день после инфицирования титр вируса в легких составил  $10^{0,4}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, в носовых ходах вирус не выявлялся (см. табл. 1). В то же время вирулентный штамм А/Кр/дт в тех же опытах размножался в легких до титра  $10^{3,6}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, а в носовых ходах — до  $10^{1,3}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Штамм В/Вик/41, прошедший 41 пассаж при пониженной температуре, был способен размножаться в легких, но лишь до титра  $10^{1,8}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Штамм В/Вик/63, прошедший 63 пассажа, почти полностью утратил способность к размножению в легких мы-

шей (титр  $10^{0,4}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл) при титре вируса в легких мышей, инфицированных штаммом В/Вик/дт,  $10^{3,9}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. В носовых ходах титр вируса при инфицировании мышей штаммом В/Вик/41 составил  $10^{2,5}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, а при инфицировании штаммом В/Вик/63 —  $10^{2,1}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. В опытах со штаммом В/Вик/дт титр равнялся  $10^{3,9}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл (см. табл. 1).

Таким образом, исследования показали, что ха-штамм А/Кр/35 и В/Вик/63 существенно снижали способность к размножению в носовых ходах и легких мышей в отличие от вирулентных родительских вирусов.

*Иммуногенность и защитная эффективность ха-штаммов вируса гриппа.* При двукратной интраназальной вакцинации мышей ха-штаммами А/Кр/35 и В/Вик/63 в дозе  $10^{5,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/50 мкл титры антител, задерживающих гемагглютинацию, были невысокими — 1:80 для вируса А/Кр/35 и 1:40 для вируса В/Вик/63 (табл. 2). Титры IgA-антител в носовых ходах и легких составили для штамма А/Кр/35 1:40 и 1:1600 соответственно (см. табл. 2).

Так, при двукратной вакцинации мышей ха-штаммами в дозе  $10^{5,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл с последующим инфицированием 100 дозами вирулентного родительского штамма вируса титр вирулентного вируса в легких мышей, вакцинированных ха-штаммом В/Вик/63, был  $10^{2,5}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. При вакцинации мышей вирусом А/Кр/35 титр вирулентного вируса в легких равнялся  $10^{2,0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. В то же время титры вируса в легких при заражении невакцинированных мышей составили для вируса В/Вик/63  $10^{3,5}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, для вируса А/Кр/35 —  $10^{3,5}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Эти данные свидетельствуют о хорошей защитной эффективности полученных нами ха-штаммов-доноров.

*Анализ последовательности нуклеотидов в генах, кодирующих внутренние белки вирусов гриппа.* С целью выявления мутаций, приобретенных ха-штаммами вируса гриппа за время пассажей при пониженной

Таблица 1

Размножение ха-штаммов вируса гриппа в куриных эмбрионах при различных температурах, а также в носовых ходах и легких мышей

Вирус	Титр вируса при разных температурах и времени инкубирования, lgЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл			Средний титр вируса в органах мышей на 3-й день после инфицирования, lgЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл (доверительный интервал, α = 0,05)	
	26°С (6 сут)	34°С (48 ч)	38/40°С* (48 ч)	в носовых ходах	в легких
А/Кр/дт	< 10 <sup>1,5</sup> **	10 <sup>8,5</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>1,3 ± 0,4</sup>	10 <sup>3,65 ± 0,4</sup>
А/Кр/35	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>8,0</sup>	< 10	< 10	10 <sup>0,4 ± 0,4</sup>
В/Вик/дт	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>8,0</sup>	10 <sup>5,0</sup>	10 <sup>3,9 ± 0,4</sup>	10 <sup>3,9 ± 0,3</sup>
В/Вик/41	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>8,5</sup>	10 <sup>1,5</sup>	10 <sup>2,5 ± 0,4</sup>	10 <sup>1,8 ± 0,7</sup>
В/Вик/63	10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>8,0</sup>	< 10	10 <sup>2 ± 0,6</sup>	10 <sup>0,4 ± 0,4</sup>

Примечание. \* — инфицированные куриные эмбрионы инкубировали для ха-А/Кр/35 при 40°С, для ха-В/Вик/63 при 38°С; \*\* — титры вируса в ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Таблица 2

Иммуногенность и защитная эффективность ха-штаммов вируса гриппа

Иммуногенность				Защитная эффективность			
титр антител в сыворотке крови (РЗГА)		титр IgA-антител (ИФА) (А/Кр/35)		титр дикого вируса в легких мышей, ЭИД <sub>50</sub> /0,1 мл			
А/Кр/35	В/Вик/63	в носовых ходах	в легких	А/Кр/35		В/Вик/63	
				контроль (невакцинированные мыши)	вакцинированные мыши	контроль (невакцинированные мыши)	вакцинированные мыши
1:80	1:40	1:40	1:1600	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>2,0</sup>	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>2,5</sup>

Примечание. РЗГА — реакция задержки гемагглютинации.

температуре, в генах, кодирующих внутренние белки, было проведено секвенирование кодирующих участков всех внутренних генов ха-штаммов и их вирулентных родительских вирусов.

Штамм А/Кр/35 за время пассажей приобрел 13 нуклеотидных замен во всех генах, кодирующих внутренние белки, и которых 8 привели к замене аминокислот в генах PB2, PB1, PA, NP, M1 и M2 (табл. 3). Из этих мутаций 10 нуклеотидных позиций уникальны среди всех последовательностей нуклеотидов всех штаммов вируса гриппа А/Н2N2, А/Н3N2 и А/Н1N1, представленных в базе данных GenBank. Следует отметить, что все аминокислотные замены штамма А/Кр/35 уникальны для данного штамма и произошли в консервированных участках белков.

При определении наличия ts-мутаций в отдельных генах ха-штамма А/Кр/35 с помощью комплементарно-рекомбинационного теста с использованием одноударных ts-мутантов вируса гриппа Н7N7 было обнаружено наличие ts-мутаций в генах PA, PB1, NP и NS.

Анализ мутаций в ха-штамме вируса В/Вик/41, прошедшем 41 пассаж при пониженной температуре, выявил 6 мутаций в генах PB2, PB1, PA, NP, M1 и NS1, 5 из которых привели к замене аминокислот. В ха-штамме В/Вик/63, прошедшем при пониженной температуре на 21 пассаж больше, обнаружены 2 дополнительные мутации в генах PA с заменой аминокислоты и M1 без замены аминокислоты (табл. 4). Следует отметить, что 5 из 6 аминокислотных замен были уникальными по сравнению со всеми штаммами вируса гриппа В из базы данных GenBank, а 6-я замена встречалась лишь у 3% проанализированных штаммов вируса.

*Иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов.* Анализ иммунофенотипа спленоцитов мышей, вакцинированных ха-штаммом А/Кр/35, показал (табл. 5), что при вакцинации мышей этим штаммом наблюдается снижением количества Т-лимфоцитов,

несущих маркеры CD3, CD4 и CD8, в 1-й и на 7-й дни после первой и второй вакцинации, а также CD5 на 7-й день после первой и в 1-й день после второй вакцинации. В то же время наблюдалось увеличение количества клеток CD16 и НКТ в 1-й и на 7-й день после первой и второй вакцинации и в 1-й день после второй вакцинации, клеток CD21 на 7-й день после первой и второй вакцинации, CD71 на 7-й день после первой и в 1-й день после второй вакцинации, а также клеток, несущих маркеры  $\gamma\delta$ -Т, в 1-й и на 7-й день после первой вакцинации, и существенно повышалось количество TLR-9-экспрессирующих клеток.

Следует отметить, что введение мышам вирулентного штамма А/Кр/дт сопровождалось увеличением количества клеток, экспрессирующих CD4/CD5, повышением численности клеток, экспонирующих молекулы антигенного представления МНСII, увеличением количества  $\gamma\delta$ -TCR-клеток, повышением количества клеток, экспонирующих TLR-9. Наряду с этим наблюдалось снижение численности субпопуляции CD3-, NK/CD3-, CD5- и CD4-позитивных клеток и цитотоксических лимфоцитов CD8.

Интраназальная вакцинация мышей штаммом А/Кр/35 приводила также к умеренному повышению численности TLR-9-позитивных клеток, особенно после первой иммунизации. При изучении цитокинового профиля спленоцитов мышей, вакцинированных этим ха-штаммом, отмечена умеренная активация цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 и IL-10 на 7-е сутки после первой иммунизации. В то же время уровень TNF- $\alpha$  был резко снижен в первую неделю после вакцинации. После второй вакцинации наблюдалось значительное повышение уровня большинства изученных цитокинов. При инфекции мышей вирулентным родительским штаммом А/Кр/дт отмечена высокая активация цитокинов IFN- $\gamma$ , GM-CSF и IL-10.

В данном исследовании путем пассажей при пониженной температуре вирусов гриппа А/Красно-

Таблица 3

Мутации в генах, кодирующих внутренние белки ха-штамма А/Кр/35, по сравнению с родительским штаммом А/Кр/дт

Сегмент РНК	Длина (нукл.)	Мутации в нуклеотидной последовательности				Белок	Длина (ак)	Аминокислотные замены		
		позиция	уникальность*	А/Кр/дт	А/Кр/35			позиция	А/Кр/дт	А/Кр/35
1	2341	841	Да	GUA	UUA	PB2	759	290	Val	Leu
		1494	"	UCC	UCU			—	—	—
		1500	Нет	GCG	GCA			—	—	—
2	2341	464	Да	AUA	ACA	PB1	757	147	Ile	Thr
		1983	Нет	AAA	AAG			—	—	—
3	2233	597	Да	UUU	UUC	PA	716	—	—	—
		927	Нет	GGG	GGA			—	—	—
		2145	Да	UUC	UUA			707	Phe	Leu
5	1565	1151	"	GAA	GUA	NP	498	369	Glu	Val
		1343	"	GCA	GUA			433	Ala	Val
7	1027	332	"	CUU	AUU	M1	252	103	Leu	Ile
		413	"	CUC	AUC			130	Leu	Ile
		837	"	AUU	GUU			42	Ile	Val
8	890	—	—	—	—	NS1	237	—	—	—
		—	—	—	—			NS2	121	—

Примечание. \* — уникальность по сравнению с вирусами гриппа А человека из базы данных GenBank. Здесь и в табл. 4: ак — аминокислотные остатки; нукл. — нуклеотиды.

Мутации в генах, кодирующих внутренние белки ха-вариантов В/Вик/41 и В/Вик/63, по сравнению с исходным штаммом В/Вик/дт

Сегмент РНК	Длина (нукл.)	Мутации в нуклеотидной последовательности					Белок	Длина (ак)	Аминокислотные замены			
		позиция	уникальность*	В/Вик/Дт	В/Вик/41	В/Вик/63			позиция	В/Вик/дт	В/Вик/41	В/Вик/63
1	2396	555	Да	AGG	AAG	AAG	PB2	770	185	Arg	Lys	Lys
2	2386	366	"	GAC	GGC	GGC	PB1	752	120	Asp	Gly	Gly
3	2304	972	Нет	ACA	ACT	ACT	PA	726	—	—	—	—
		<b>1885</b>	<b>Нет</b>	<b>GTA</b>	<b>GTA</b>	<b>ATA</b>			<b>625</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>He</b>
5	1841	156	Да	CCA	TCA	TCA	NP	560	40	Pro	Ser	Ser
7	1191	70	"	GAA	AAA	AAA	M1	248	23	Glu	Lys	Lys
		<b>387</b>	<b>Нет</b>	<b>CTC</b>	<b>CTC</b>	<b>CTT</b>			—	—	—	—
		—	—	—	—	—	BM2	109	—	—	—	—
8	1096	62	Да	GGT	AGT	AGT	NS1	281	13	Gly	Ser	Ser
							NS2	122				

Примечание. \* — уникальность по сравнению с вирусами гриппа В из базы данных GenBank; мутации, отличающие штамм В/Вик/63 от штамма В/Вик/41, отмечены жирным шрифтом.

дар/101/59 и В/Виктория/2/87 были получены ха-штаммы А/Кр/35 и В/Вик/63. Эти ха-штаммы не размножались при повышенной температуре, но были способны размножаться при 26°C и отличались существенно сниженной способностью размножаться в легких мышей, а также обладали хорошей иммуногенностью и защитной активностью в опытах на мышах. Ха-штаммы хорошо размножались как в куриных эмбрионах, так и в линии клеток MDCK без изменения ts- и са-признаков.

Ха-штамм А/Кр/35 получили после 35 пассажей при пониженной температуре. Российский штамм А/Ленинград/34/17/57 был получен после 17 пассажей при пониженной температуре, а штамм А/Ленинград/17/47/57 — после 47 пассажей и обладал большей аттенуацией [4]. Американский штамм А/ЭннАрбор/6/60 получили после 52 пассажей [24, 25]. В то же время для получения ха-штамма В/Вик/63 понадобилось 63 пассажа. Штамм В/СССР/60/69 был получен после 60 пассажей [1]. Эти результаты согласуются с данными литературы о более медленной динамике накопления мутаций у вирусов гриппа В [28]. Однако для получения американского ха-штамма В/ЭннАрбор/1/66 потребовалось 13 пассажей [24, 26].

Следует отметить, что подавляющее число мутаций в геноме полученных нами ха-штаммов уникальны для конкретного штамма, т. е. не встречаются у эпидемических штаммов вируса гриппа. Это свидетельствует о том, что мутации, отвечающие за ts-, са- и att-фенотипы, возникают в консервативных и соответственно функционально важных участках.

Сравнительное изучение влияния вакцинации мышшей ха-штаммом А/Кр/35 показало, что при интраназальной вакцинации снижается численность субпопуляции ряда лимфоцитов (CD3, CD4, CD5, CD8) при вакцинации не только диким штаммом А/Кр/дт, но и ха-штаммом А/Кр/35. Вместе с тем наблюдалось увеличение численности ряда лимфоцитов, несущих маркеры CD16, NKT, CD2,  $\gamma\delta$ -Т и TRL-9. Следует отметить, что транзиторную супрессию отмечали при вакцинации мышшей живыми гриппозными вакцинами и в ряде других исследований [5, 6, 11], а также при парентеральной вакцинации мышшей инактивированной гриппозной вакциной [15].

К сожалению, интраназальная вакцинация мышшей живой вакциной приводит к снижению числа таких Т-лимфоцитов, как CD4, CD5 и CD8, являющихся особенно важными при иммунитете против гриппа [32].

Несмотря на то что все изученные к настоящему времени ха-штаммы вируса гриппа обладают сходными свойствами (ts, са, att), количество мутаций и генов, имеющих мутации, у всех этих штаммов не одинаково. Так, в ха-штамме А/Ленинград/134/17/57 в 6 генах (PB1, PB2, PA, M1, M2 и NS2) выявлены 11 мутаций, из которых 8 привели к замене аминокислот; в более аттенуированном штамме А/Ленинград/134/47 в 7 генах (PB2, PB1, PA, NP, M1, M2, NS2) выявлены 17 мутаций, из них 11 с заменой аминокислот [22]. В ха-штамме А/Кр/35 обнаружены 13 мутаций в 5 генах (PB2, PB1, PA, NP и M2), из которых 8 привели к замене аминокислот. В штамме А/ЭннАрбор/6/60 обнаружены в 6 генах (PB2, PB1, PA, NP, M2, NS) 24 мутации, из них 11 с изменением аминокислот [10, 31]. В ха-штамме В/Вик/63 обнаружены в 6 генах (PB2, PB1, PA, NP, M1 и NS1) 8 мутаций, из которых 6 привели к замене аминокислот. В штамме В/ЭннАрбор/1/66 выявлены 8 мутаций в генах PA, M1 и NP [8].

Таким образом, все эти ха-штаммы-доноры получены при пассажах при пониженной температуре, однако число пассажей было различным, а количество мутаций не одинаковым.

В отношении конкретных генов или мутаций в гене, определяющих проявление ts-, са- и att-признаков ха-штаммов вируса гриппа, пока трудно выявить определенные мутации или гены. Было показано, что для большинства этих признаков необходимо участие нескольких генов. Так, у штамма А/Ленинград/134/17/57 в проявлении ts-признака участвуют мутации в генах PB2 и PB1 [20]. Имеются данные о том, что этот штамм хорошо аттенуирован для людей, даже если в ха-реассортанте содержится лишь М-ген от аттенуированного ха-штамма-донора [13]. У ха-штамма А/ЭннАрбор/11/66 проявление ts- и att-признаков связано с мутациями в генах PB2 и PB1 [18]. Два гена — PA и NP, а по другим данным 3 гена — PB1, PB2 и NP — участвуют в проявлении ts-фенотипа [7, 19]. Гены PA, PB1, PB2 и NP независимо участвуют в проявлении att-фенотипа [32]. Однако имеются данные, что мута-

Иммунофенотип лимфоцитов селезенки мышей при интраназальном введении холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59

Препарат	Иммунизация	Время взятия селезенки, сутки	Содержание клеток ( $M \pm SD$ ), %											
			CD3	CD16	НКТ	CD8	CD4	CD25	T-reg	CD71	CD5	I-AK	$\gamma\delta$ -T	CD21
Контроль			61 ± 5,2	11 ± 0,9	4 ± 0,5	24 ± 2,1	36 ± 3,1	5 ± 0,4	2 ± 0,2	28 ± 2,3	46 ± 4,3	45 ± 3,8	4 ± 0,4	9 ± 0,7
А/Кр/35*	Первая	1-е	63 ± 5,7	38 ± 3,3**	12 ± 0,9**	24 ± 1,1	30 ± 2,6	6 ± 0,4	4 ± 0,4**	21 ± 1,6**	45 ± 4,4	31 ± 2,7**	10 ± 0,7**	7 ± 0,6
		7-е	35 ± 2,6**	16 ± 1,1**	6 ± 0,5	11 ± 0,5**	17 ± 1,5**	6 ± 0,5	1 ± 0,3	36 ± 3,2**	23 ± 1,7**	41 ± 3,8	11 ± 0,7**	17 ± 1,4**
	Вторая	1-е	34 ± 2,7**	30 ± 2,8**	9 ± 0,8**	12 ± 1*	19 ± 1,7**	8 ± 0,5**	3 ± 0,2	40 ± 3,9**	25 ± 1,9	42 ± 3,6	6 ± 0,5	12 ± 0,7
		7-е	49 ± 3,6**	17 ± 1,4**	3 ± 0,3	16 ± 1,4**	28 ± 2,5**	8,4 ± 0,5**	3,8 ± 0,4**	58 ± 4,38	56 ± 5,3**	60 ± 5,6**	5,2 ± 4,8	20 ± 1,7**

Примечание. \* — А/Кр/35 — холодоадаптированный штамм А/Краснодар/101/35/59; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой по  $t$ -критерию Стьюдента.

ция только в гене PB2 этого вируса может приводить к появлению ts-фенотипа [33].

У ха-штамма В/СССР/60/69 ts-признак связан с генами PB2 и PA, а са-признак — с геном PB1 [21]. У ха-штамма В/ЭннАрбор/1/66 мутации в генах PB2, PA и NP, а по другим данным — в генах PA и NP связаны с проявлением са-признака [8, 9, 17]. Мутации в генах PA и NP вместе с мутацией в гене M1 приводят к появлению att-признака [17]. Сравнение ts- и са-признаков полученных нами штаммов В/Вик/41 и ха-штамма В/Вик/63, различающихся по количеству пассажей, позволяет сделать вывод о важной роли мутации в гене PA в проявлении этих признаков (см. табл. 3).

Таким образом, сравнительный анализ количественных мутационных изменений в определенных генах и их связи с ts-, са- и att-признаками у охарактеризованных до настоящего времени ха-штаммов вируса гриппа не позволяет связать аттенуацию, равно как и другие признаки, с какой-либо определенной мутацией или мутантным геном, тем более что в проявлении многих признаков аттенуированных штаммов участвует несколько генов. Тем не менее следует упомянуть, что путем введения с помощью сайт-направленного мутагенеза ряда мутаций, выявленных в генах PB1 и PB2 ха-штамма вируса гриппа А/ЭннАрбор/6/60, в геном вирулентного штамма вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/33 удалось передать этому вирусу ts- и att-фенотипы, присущие исходному штамму [19]. Сходные данные были получены и с ха-штаммом В/ЭннАрбор/1/66 [17].

Еще один вопрос, который возникает при анализе мутаций в генах ха-штаммов вируса гриппа, связан с мутациями, не приводящими к замене аминокислот. Нельзя исключить возможную роль и таких мутаций в формировании att-фенотипа.

Поскольку по количеству и расположению мутаций ха-штаммы А/Кр/35 и В/Вик/63 отличаются от других российских, как и от американских ха-штаммов вируса гриппа, не исключено, что живая гриппозная вакцина, приготовленная на основе этих ха-штаммов — доноров аттенуации, может обладать несколько иными свойствами, возможно, меньшей реактогенностью для маленьких детей и большей иммуногенностью для пожилых лиц. Можно полагать, что полученные нами ха-штаммы могут оказаться перспективными штаммами — донорами аттенуации при получении реассортантов для живой гриппозной вакцины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г. И., Климов А. И. Живая вакцина против гриппа. СПб., 1994.
2. Ахматова Н. К., Егорова Н. Б., Курбатова Е. А. и др. Влияние хитозана на иммунофенотип и функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов мышей при иммунизации инактивированной противогриппозной вакциной. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008; 6: 31—35.
3. Гендон Ю. З. Живая холодоадаптированная гриппозная вакцина: современное состояние. Вопросы вирусологии. 2011; 1: 4—17.
4. Киселева И. В., Климов А. И., Григорьева Е. П. и др. Генетический и фенотипический анализ гетерогенной популяции холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и реассортантных гриппозных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе. Вопросы вирусологии. 2005; 5: 14—18.
5. Рекстин А. Р., Найхин А. Н., Баранцева И. Б. и др. В-клеточный цитотоксический лимфоцитарный иммунный ответ на патогенные, аттенуированные и реассортантные вирусы гриппа. Вопросы вирусологии. 2002; 4: 27—32.
6. Рекстин А. Р., Лу К., Кац Д. и др. Особенности продукции ранних цитокинов in vivo после инфицирования вирусом гриппа

- A/Ленинград/134/57 (H2N2) и его холодоадаптированными аттенуированными вариантами. Вопросы вирусологии. 2006; 2: 27—31.
7. Chan W, Zhou H, Kemble G. et al. The cold adapted and temperature sensitive influenza A/Ann Arbor/6/60 virus, master donor virus for olive attenuated influenza vaccines, has multiple defects in replication at the restrictive temperature. *Virology*. 2008; 380: 304—311.
  8. Chen Z, Aspelund A, Kemble G. et al. Genetic mapping of the cold-adapted phenotype of B/Ann Arbor/1/66, the master donor virus for live attenuated vaccine (FluMist). *Virology*. 2006; 345: 416—423.
  9. Chen Z, Aspelund A, Kemble G. et al. Molecular studies of temperature-sensitive replication of the cold-adapted B/Ann Arbor/1/66, the master donor virus for live attenuated influenza Flu Mist vaccines. *Virology*. 2008; 380: 354—362.
  10. Cox N, Kitame F, Kendal A. et al. Identification of sequence change in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology*. 1988; 167: 554—567.
  11. Ennis F, Rook A, Qi Y. et al. HLA restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines. *Lancet*. 1981; 2: 887—891.
  12. Donabedian A, DeBorde D, Cook S. et al. A mutation in the PA protein gene of cold-adapted B/Ann Arbor/1/66 influenza virus associates with reversion of temperature sensitivity and attenuated virulence. *Virology*. 1988; 163: 444—451.
  13. Ghendon Y, Klimov A, Alexandrova G. et al. Analysis of genom composition and recombination of recombinants of cold-adapted and virulent strains. *J. Gen. Virol.* 1981; 53: 215—224.
  14. Ghendon Y, Polezhaev F, Lisovskaja A. et al. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. and Immun.* 1984; 44: 730—733.
  15. Ghendon Y, Markushin S, Vasiliev Y. et al. Evaluation of properties of chitozan as an adjuvant for inactivated influenza vaccines administrated parenterally. *J. Med. Virol.* 2009; 81: 494—506.
  16. Herlocher M, Clavo A, Maassab H. Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. *Virus Res.* 1996; 42: 11—25.
  17. Hoffmann E, Mahmood K, Chen Z. et al. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J. Virol.* 2005; 79: 11014—11021.
  18. Jin H, Lu B, Zhou H. et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strain (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18—24.
  19. Jin H, Zhou H, Lu B. et al. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78: 995—998.
  20. Kiseleva I, Klimov A, Su Q. et al. Role of individual genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) cold-adapted donor strain in manifestation of the temperature-sensitive phenotype of reassortant influenza A viruses. *Int. Congress. Series.* 2004; 1263: 547—550.
  21. Kiseleva I, Voeten T, Teley L. et al. PB2 and PA genes control the expression of the temperature sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/6/60 influenza master donor virus. *J. Gen. Virol.* 2009. do.10.1099/vir.0.01799-0.
  22. Klimov A, Cox N, Yotov W. et al. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus. *Virology*. 1992; 186: 795—797.
  23. Lee K, Seo S, Song J. et al. Characterization of live influenza vaccine donor strain derived from cold-adaptation of X-31 virus. *Vaccine*. 2006; 24: 1966—1974.
  24. Maassab H. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967; 213: 612—614.
  25. Maassab H. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza viruses. *J. Immunol.* 1969; 102: 728—732.
  26. Maassab H, DeBorde D. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine*. 1985; 3: 355—369.
  27. Nichol K, Mendelman P, Mallon K. et al. Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial. *J. A. M. A.* 1999; 282: 137—144.
  28. Nobusava E, Sato K. Comparison of mutation rates of human influenza A and B viruses. *J. Virol.* 2006; 80: 3675—3678.
  29. Rudenko L, Arden N, Grigorieva E. et al. Safety and immunogenicity of Russian live attenuated and USA inactivated influenza vaccines in elderly. In: *Option of the control of influenza III.* Elsevier Science. 1996; 572—578.
  30. Seo S, Byun Y, Lee E. et al. Development and characterization of live attenuated influenza B virus vaccine candidate. *Vaccine*. 2008; 26: 874—881.
  31. Snyder M, Betts R, De Borde D. et al. Four viral genes independently contributed to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccine. *J. Virol.* 1988; 62: 488—495.
  32. Stevenson P, Doherty P. Cell-mediated immunoresponse to influenza. In: *Nikolson K. et al., eds. Textbook of influenza.* Blackwell Science. 1998; 278—287.
  33. Treanor J, Perkins M, Battaglia R. et al. Evaluation of the genetic stability of the temperature-sensitivity PB2 gene mutation of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted vaccine virus. *J. Virol.* 1994; 68: 7684—7686.

Поступила 12.02.12

# РА Регионарная анестезия

## и лечение острой боли

Журнал

«Регионарная анестезия и лечение острой боли»  
в издательстве «Медицина» с 2013 г.