

16. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2517–24.
17. Smeets D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 126–33.
18. Teijaro J.R., Walsh K.B., Cahalan S. et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 2011; 146: 980–91.
19. Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 134.
20. Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P. et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 16–32.
21. Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R. B., Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(3): 551–6.
22. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H.J. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83: 171–8.
8. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2359–76.
9. Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 155–62.
10. Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 882–7.
11. Michaelis M., Geiler J., Naczek P. et al. Glycyrrhizin inhibits highly pathogenic H5N1 influenza A virus-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010; 199: 291–7.
12. Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32: 409–22.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
14. Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.* 1998; 37: 83–95.
15. Schröfelbauer B., Raffetseder J., Hauner M. et al. Glycyrrhizin, the main active compound in licorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling. *Biochem. J.* 2009; 421: 473–82.
16. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2517–24.
17. Smeets D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 126–33.
18. Teijaro J.R., Walsh K.B., Cahalan S. et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 2011; 146: 980–91.
19. Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 134.
20. Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P. et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 16–32.
21. Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R. B., Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(3): 551–6.
22. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H.J. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83: 171–8.

REFERENCES

1. Smirnov V.S., ed. *Clinical pharmacology of Thymogen*. Spb. PHARMIndex; 2004.
2. Smirnov V.S., Zarubae V.V., Anfimov P.M., Shtro A.A. Effect of a combination of glutamyl-tryptophan and glycyrrhizic acid on the course of acute infection caused by influenza (H3N2) virus in mice. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(3): 23–7.
3. Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 1188–93.
4. Alleva L.M., Gualano R.C., Clark I.A. Current work and future possibilities for the management of severe influenza: using immunomodulatory agents that target the host response. *Future Virol.* 2011; 6: 843–54.
5. Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *Recomm. Rep.* 2011; 60(1): 1–26.
6. Forst C.V. Influenza infection and therapy: a system approach. *Future Virol.* 2012; 7: 973–88.
7. Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009; 82: 95–102.

Поступила 15.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 578.832.1:578.53].083.2:615.371.012.6

И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины

ФГБУ "НИИ экспериментальной медицины" СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург

Современные живые гриппозные вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с холодоадаптированным донором аттенуации. Два донора аттенуации – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 – применяются в России для подготовки вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины методами классической реассортации. Вакцинный штамм 6:2 содержит 2 поверхностных антигена – гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) от актуального вируса гриппа и 6 генов, кодирующих внутренние белки, – от донора аттенуации.

В настоящем исследовании проведен анализ сложностей в подготовке вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, связанных с постоянно меняющимися биологическими свойствами циркулирующих вирусов гриппа.

Показано, что наиболее высокий процент получения реассортантных вакцинных штаммов 6:2 достигается, если эпидемические родительские вирусы устойчивы к неспецифическим гамма-ингибиторам.

Методами классического скрещивания вирусов H5N1-PR8 с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) не удалось получить реассортанты 6:2, содержащие HA и NA птичьего происхождения. Это может объясняться особенностями жесткой констелляции генов указанных вирусов. Была выявлена прочная связь между генами PB2/PR8 и птичьей NA, которые всегда наследовались реассортантами вместе. Если же в геном реассортантного вируса включался ген PB2 донора аттенуации, NA также наследовалась от него.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; реассортация; констелляция генов; несовместимость генов.

Peculiarity of reassortment of current wild type influenza viruses with master donor viruses for live influenza vaccine

Institute of Experimental Medicine, Northwest Branch, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia

The live attenuated influenza vaccine (LAIV) currently licensed in Russia consists of the reassortant viruses with hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) gene segments from the circulating wild-type viruses and the six internal protein-encoding gene segments from cold-adapted master donor viruses (MDV) A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) or B/USSR/60/69. Presently, only classical reassortment technique is approved for the generation of Russian LAIV strains.

In this work, we describe the obstacles to the development of LAIV 6:2 vaccine strains depending on the phenotypic properties of the wild-type viruses used for reassortment.

It was demonstrated that the highest percentage of 6:2 vaccine reassortants could be achieved when wild-type parental viruses were resistant to non-specific gamma-inhibitors.

It was shown that it was impossible to generate 6:2 vaccine reassortants possessing six internal genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) master donor virus and avian HA and NA genes from H5N1-PR8 viruses using classical reassortment technique. It was suggested that strong constellation effects between the gene segments of the parental viruses could affect the virus gene reassortment. A strong interaction between the genome segments encoding neuraminidase of avian origin and PB2 gene of PR8 virus was observed. When the PB2 gene was inherited from cold-adapted master donor virus, the neuraminidase was also found to be of MDV origin.

Key words: live influenza vaccine; reassortment; gene constellation; gene compatibility.

Введение

Современные живые гриппозные реассортантные вакцины (ЖГВ) представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с аттенуированным холодоадаптированным (ХА) донором аттенуации. Два ХА донора аттенуации – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 – применяются в России для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ. Вакцинный 6:2 реассортант содержит 2 поверхностных антигена – гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) от актуального вируса гриппа и 6 генов, кодирующих внутренние белки, от донора аттенуации. Отдел вирусологии ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН (Санкт-Петербург) является единственным в России структурным подразделением, на которое Министерством здравоохранения России возложена обязанность ежегодной подготовки вакцинных штаммов ЖГВ.

В настоящем исследовании проведен анализ сложностей в подготовке вакцинных штаммов ЖГВ, связанных с постоянно меняющимися биологическими свойствами циркулирующих вирусов гриппа. Работа выполнена на основе анализа 860 реассортантов с различной формулой генома, полученных при скрещивании вирусов дикого типа (wt) с ХА донорами аттенуации.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использованы 37 диких вирусов гриппа А и В, полученных в Центре по контролю за заболеваемостью (CDC, США), 5 реассортантных вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ), подготовленных на основе различных штаммов вируса гриппа А (в том числе высокопатогенных), и донора высокой урожайности – вируса А/PR/8/34 (H1N1) (PR8): IRV-148 (H1N1) (А/Брисбен/59/2007 × PR8), NIB-64 (H3N2) (А/Перт/16/2009 × PR8), NIBRG-23 (H5N1) (А/индюк/Турция/1/05 × PR8), INDO/05 (H5N1) (А/Индонезия/05/2005 × PR8), VN1203 (H5N1) (А/Вьетнам/1203/2004 × PR8), полученных из коллекции NIBSC (Великобритания) и CDC (США), а также 2 ХА донора аттенуации отечественной ЖГВ – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Л17) и В/СССР/60/69 из

коллекции Отдела вирусологии ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН. Вирусы поддерживали путем пассажей в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Получение реассортантов осуществляли в РКЭ по стандартной методике [1].

Анализ генома реассортантных штаммов проводили с помощью метода микс-ПЦР, основанного на различиях в размерах соответствующих амплифицируемых фрагментов генов донора аттенуации или дикого вируса [2].

Оценку ингибиторочувствительности вирусов гриппа к гамма-ингибиторам нормальной сыворотки крови производили в стандартной реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [3] с 1% эритроцитами человека группы крови 0(I) Rh⁺, используя в качестве источника ингибиторов нормальную лошадиную сыворотку производства ООО "Биолот" (Санкт-Петербург), разведенную 1:10 и прогретую при 100°C в течение 5 мин. Вирусы считали ингибиторостойчивыми (ИУ) при титре лошадиной сыворотки в РТГА ≤ 1:40 и ингибиторочувствительными (ИЧ) при титре ≥ 1:80.

Результаты и обсуждение

Классический метод получения реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ с формулой генома 6:2 включает скрещивание в РКЭ при 32°C родительских вирусов (донора аттенуации и эпидемического вируса, взятых в равных инфекционных дозах), селективные пассажи в присутствии антисыворотки к донору аттенуации при пониженной до 25–26°C температуре с последующим клонированием предельными разведениями [1]. Теоретически при скрещивании двух штаммов вируса гриппа возможно формирование 256 различных комбинаций генов. Использование двух мощных селективирующих факторов (антисыворотки к донору аттенуации и пониженной температуры инкубации) приводит к существенному снижению количества нежелательных комбинаций, однако в ряде случаев их число остается достаточно большим.

До конца 1990-х – начала 2000-х годов на основе циркулирующих в те годы вирусов гриппа А и В удавалось регулярно получать вакцинные штаммы с желаемой формулой генома 6:2. При этом НА и NA практически

всегда переходили в геном вакцинного реассортанта от эпидемического родителя, а гены, кодирующие белки нуклеопротеидного комплекса (PB2, PB1, PA и NP) – от ХА донора аттенуации. Процент "холодных" М- и NS-генов был также достаточно высок (см. рисунок, а, в). Однако в последние годы появляется все больше случаев разобщения генов, кодирующих HA и NA. Снизилось также число реассортантов, наследующих внутренние гены от доноров аттенуации (см. рисунок, б, г).

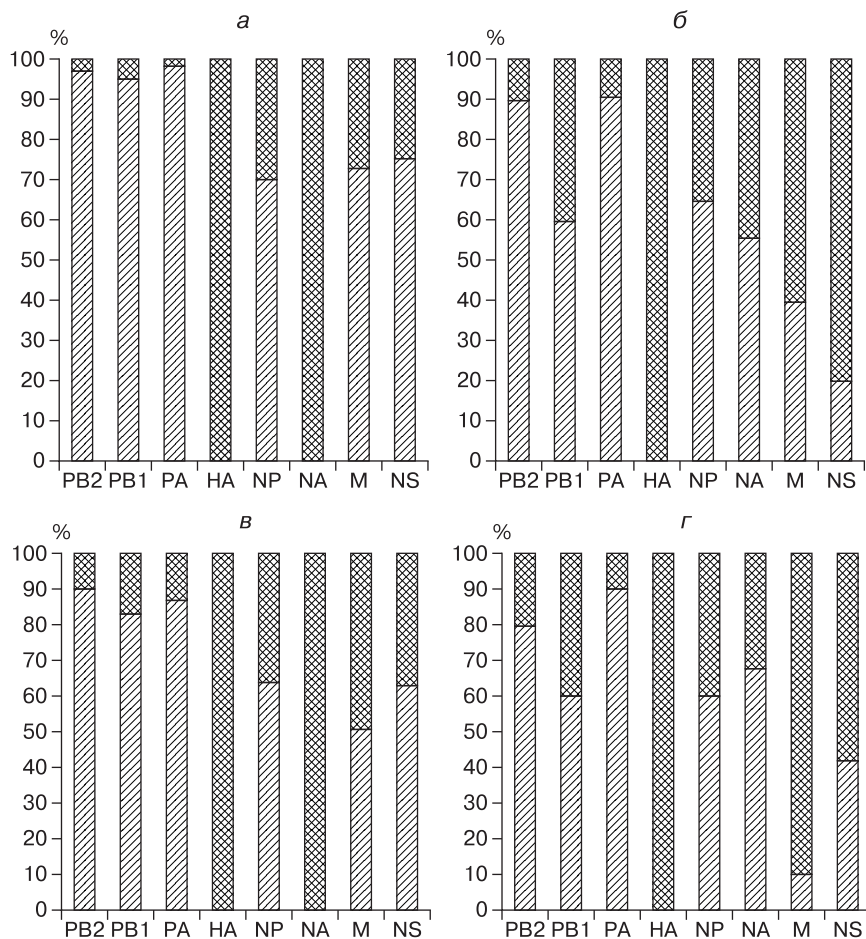
На эффективность подготовки вакцинных штаммов могут оказывать существенное влияние фенотипические свойства эпидемического вируса. В частности существуют природно устойчивые вирусы гриппа [4]. При стандартной процедуре их реассортации с ХА донорами теряется один из двух селектирующих факторов – пони-

женная температура инкубации. Температурочувствительные вирусы гриппа, получившие в последнее время широкое распространение [5], не позволяют использовать ts-маркер (маркер температурочувствительности) при первичном скрининге реассортантов.

В настоящем исследовании мы уделили внимание еще одному свойству вируса гриппа – его чувствительности к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам сыворотки крови, поскольку эпидемические вирусы, рекомендуемые в последние годы Всемирной организацией здравоохранения для подготовки актуальных вакцинных штаммов, все чаще обладают этим признаком. Таков в частности целый ряд современных вирусов гриппа А (H3N2) и подавляющее большинство вирусов гриппа В линии Ямагата [6].

Был проведен анализ эпидемических родительских вирусов по признаку их чувствительности к термостабильным гамма-ингибиторам. Вне зависимости от принадлежности дикого родителя к определенному серотипу/сероподтипу, NA ИУ вирусов встраивалась в геном реассортантных вирусов значительно чаще, чем NA ИЧ вирусов (табл. 1). Геномный анализ реассортантов, подготовленных на основе 20 ИЧ вирусов, показал, что только 1/3 от общего числа клонов (143 из 545) унаследовала NA дикого типа, притом что некоторые реассортанты ИЧ вирусов, таких как А/Нанчанг/933/95 (H3N2) и А/Токио/3/67 (H2N2), наследовали NA исключительно от дикого родителя. Наоборот, среди 315 ИУ реассортантов всего 20 приобрели NA от донора аттенуации (табл. 2).

Известно, что ингибиторочувствительность или устойчивость вируса гриппа к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови определяется свойствами его HA [7]. Указанный признак наследуется реассортантными вирусами вместе с геном, кодирующим этот поверхностный белок. Некоторые авторы отводят определенную роль в формировании ингибиторочувствительности не только HA, но и NA. В частности установлено, что ингибиторы сыворотки препятствуют проникновению ИЧ вируса в клетку в результате конкуренции за SA-альфа-2,6-Gal-рецептор HA. Ингибирование NA природно-устойчивых к ингибиторам вирусов гриппа приводило к тому, что эти вирусы становились ИЧ [8]. Возможно, наследование реассортантным штаммом HA от дикого, а NA от ХА родителя (см. рисунок, б, г) может быть связано с особенностями HA и NA дикого вируса. Реассортанты, несущие HA ИЧ донора аттенуации, в процессе реассортации нейтрализуются антисывороткой к донору, а его NA, вероятно, имеет определенные преимущества перед NA ИЧ дикого вируса и каким-то образом конкурирует с ней при встраивании в геном реассортантного вируса. Возможно, такие конкурентные отношения могут быть объяснены определенной, еще не установленной ролью NA в формировании ИЧ фенотипа вируса гриппа.



Наследование реассортантными штаммами генов от донора аттенуации или от вируса гриппа дикого типа.

По оси абсцисс – гены вируса гриппа; по оси ординат – наследование реассортантными штаммами генов от того или иного родительского вируса (в %); светлые столбики – гены от донора аттенуации; черные столбики – гены от вируса гриппа дикого типа.

а – реассортанты между донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и дикими вирусами, циркулировавшими до 2000 г.; б – реассортанты между донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и дикими вирусами, циркулировавшими после 2000 г.; в – реассортанты между донором аттенуации В/СССР/60/69 и дикими вирусами, циркулировавшими до 2000 г.; г – реассортанты между донором аттенуации В/СССР/60/69 и дикими вирусами, циркулировавшими после 2000 г.

Проанализированы реассортанты, подготовленные на основе следующих диких вирусов гриппа А и В: А/Пекин/262/95 (H1N1), А/Перт/13/95 (H1N1), А/Нанчанг/933/95 (H3N2), А/Иоганнесбург/82/96 (H1N1), А/Сидней/5/97 (H3N2), А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Панама/2007/99 (H3N2), А/Тонконг/1186/03 (H3N2), А/Вайоминг/3/03 (H3N2), А/Малайзия/01/04 (H3N2), А/Калифорния/07/04 (H3N2), А/Веллингтон/01/04 (H3N2), А/Висконсин/67/05 (H3N2), А/Соломоновы острова/3/06 (H1N1), А/Брисбен/59/07 (H1N1), А/Брисбен/10/07 (H3N2), А/Калифорния/07/09 (H1N1), А/Виктория/361/11 (H3N2), В/Харбин/07/94, В/Санкт-Петербург/92/95, В/Шангдонг/7/97, В/Иоганнесбург/05/99, В/Тонконг/330/01, В/Джиллин/20/03, В/Янгу/10/03, В/Флорида/7/04, В/Малайзия/2506/04, В/Огайо/01/05, В/Флорида/4/06, В/Брисбен/3/07, В/Техас/26/08, В/Брисбен/60/08, В/Бангладеш/1994/10, В/Висконсин/1/10, В/Техас/6/11.

Таблица 1

Частота наследования NA реассортантными штаммами, полученными при скрещивании доноров аттенуации с вирусами гриппа, обладающими разной степенью чувствительности к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам

Дикий родительский вирус		Реассортанты*		
название вируса	чувствительность к гамма-ингибиторам	всего	из них унаследовали	
			wt NA	ca NA
Вирусы гриппа В				
В/Шангдонг/7/97	Устойчивый	8	8	0
В/Гонконг/330/01	"	6	6	0
В/Малайзия/2506/04	"	29	27	2
В/Огайо/01/05	"	17	17	0
В/Брисбен/60/08	"	16	14	2
В/Техас/26/08	"	12	5	7
В/Харбин/07/94	Чувствительный	4	3	1
В/Санкт-Петербург/92/95	"	8	3	5
В/Иоганнесбург/05/99	"	14	5	9
В/Джилин/20/03	"	10	4	6
В/Янгсу/10/03	"	23	9	14
В/Флорида/7/04	"	14	5	9
В/Флорида/4/06	"	31	3	28
В/Брисбен/3/07	"	13	1	12
В/Висконсин/1/10	"	140	4	136
В/Бангладеш/1994/10	"	57	19	38
В/Техас/6/11	"	12	7	5
Вирусы гриппа А (H3N2)				
А/Гонконг/1186/03	Устойчивый	8	8	0
А/Вайоминг/3/03	"	4	4	0
А/Калифорния/07/04	"	27	26	1
А/Висконсин/67/05	"	19	17	2
А/Виктория/361/11	"	16	16	0
А/Нанчанг/933/95	Чувствительный	20	20	0
А/Сидней/5/97	"	58	2	56
А/Панама/2007/99	"	7	1	6
А/Веллингтон/01/04	"	30	9	21
А/Малайзия/01/04	"	8	2	6
А/Брисбен/10/07	"	14	3	11
Вирусы гриппа А (H1N1)				
А/Пекин/262/95	Устойчивый	18	15	3
А/Перт/13/95	"	7	7	0
А/Иоганнесбург/82/96	"	6	6	0
А/Брисбен/59/07	"	13	11	2
А/Новая Каледония/20/99	"	50	50	0
А/Соломоновы острова/03/06	"	8	8	0
А/Калифорния/07/09	"	34	33	1
Вирусы гриппа А (H2N2)				
А/Калифорния/1/66	Устойчивый	5	5	0
А/Токио/3/67	Чувствительный	29	29	0
Вирусы гриппа А (H5N1)				
NIBRG-23	Устойчивый	12	12	0
VN1203	Чувствительный	42	14	28
INDO/05	"	11	0	11

Примечание. *Все реассортанты унаследовали NA от дикого родительского вируса.

Анализ эффективности получения штаммов с вакцинной формулой генома показал, что ряд использованных нами вирусов легко вступал в реассортацию с донорами аттенуации с формированием значительного числа клонов с формулой генома 6:2 (например, ИУ вирусы гриппа H1N1). При скрещивании с донорами других вирусов мы столкнулись с определенными трудностями. В частности из 29 реассортантов на основе ИЧ вируса гриппа H2N2 только 4 обладали формулой генома 5:3 и ни один – вакцинной формулой 6:2. При попытке получения вакцинного штамма ЖГВ против двух ИУ высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1 скрещиванием H5N1-PR8 реассортантов с ХА донором аттенуации J17 оказалось, что 73,6% изолированных клонов унаследовали от родителей VN1203 и INDO/05 только NA (формула генома 7:1). Гены PB2 от вируса PR8 и NA вирусов гриппа птиц всегда наследовались реассортантами вместе, и наоборот, если в геном реассортантного вируса включался ген PB2 от донора аттенуации, NA также наследовалась от донорского штамма (табл. 3). Невозможность получения 6:2 реассортантов при скрещивании ХА донора аттенуации с H5N1-PR8-штаммами для ИГВ отмечена и в работе [9].

Таким образом, H5N1-PR8 вакцинные штаммы ИГВ дают пример жесткой констелляции генов. Что же касается ИЧ H5N1-PR8 реассортанта – NIBRG-23, – то он в реассортацию не вступал вообще (см. табл. 2). Вероятно, связь генов H5N1-PR8 в геноме вируса NIBRG-23 настолько прочна, что ее практически невозможно нарушить, используя классический метод реассортации с донором аттенуации.

В литературе описаны вирусы, с трудом поддающиеся скрещиванию. В ряде случаев авторам не удалось получить реассортанты 6:2 [10]. Так, при использовании в качестве донора внутренних генов вируса гриппа чаек, несмотря на многочисленные попытки, авторы не получили реассортанты 6:2 на основе эпидемических вирусов А/Кавасаки/1/86 (H1N1) или А/Техас/36/91 (H1N1). В геноме полученных реассортантов постоянно присутствовали гены PB2, NP и NS только от эпидемических родительских вирусов. Авторы предполагают некую функциональную несовместимость генов вирусов, использованных ими для скрещивания.

Существуют определенные методы повышения эффективности процесса реассортации. В частности прибегали к инактивации дикого родителя нагреванием [11] или ультрафиолетовым облучением (УФО) [12]. В наших опытах предварительная инактивация УФО вируса NIBRG-23 (H5N1) не привела к формированию реассортантов 6:2 или 5:3, однако удалось получить 2 клон с формулой генома 7:1 (см. табл. 2).

Чтобы понять, является ли прочная связь гена NA вирусов гриппа птиц с геном PB2 от вируса PR8 свойством именно реассортантов H5N1-PR8 или любых реассортантов, подготовленных на основе вируса PR8, была произведена попытка заместить внутренними генами ХА донора аттенуации J17 внутренние PR8-гены реассортантных штаммов для сезонной ИГВ.

Структура генома реассортантов, полученных при скрещивании доноров аттенуации с вирусами гриппа, обладающими разной степенью чувствительности к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам

Дикий родительский вирус*		Реассортанты**						
количество вирусов	чувствительность к гамма-ингибиторам	всего	wt NA	ca NA	из них с формулой генома***			
					6:2	5:3	7:1	другие комбинации
Вирусы гриппа В								
6	Устойчивые	88	77 (87,5%)	11 (12,5%)	21 (23,9%)	30 (34,1%)	1 (1,1%)	36 (40,9%)
11	Чувствительные	326	63 (19,3%)	263 (80,7%)	12 (3,7%)	13 (4,0%)	91 (27,9%)	210 (64,4%)
Вирусы гриппа А (H3N2)								
5	Устойчивые	74	71 (95,9%)	3 (4,1%)	7 (9,5%)	25 (33,8%)	1 (1,4%)	41 (55,3%)
6	Чувствительные	137	37 (27,0%)	100 (73,0%)	24 (17,5%)	15 (10,9%)	9 (6,6%)	89 (65,0%)
Вирусы гриппа А (H1N1) [#]								
7	Устойчивые	136	130 (95,6%)	6 (4,4%)	71 (52,2%)	37 (27,2%)	0	28 (20,6%)
Вирусы гриппа А (H2N2)								
1	Устойчивые	5	5 (100%)	0	4 (80,0%)	1 (20,0%)	0	0
1	Чувствительные	29	29 (100%)	0	0	4 (13,8%)	0	25 (86,2%)
Вирусы гриппа А (H5N1)								
1	Устойчивые	12	12 (100%)	0	0	0	0	12 (100%)
		25 ^{###}	8 (32,0%)	17 (68,0%)	0	0	2 (8,0%)	23 (92,0%)
2	Чувствительные	53	14 (26,4%)	39 (73,6%)	0	0	39 (73,6%)	14 (26,4%)
Всего ^{###}	Устойчивых (20)	315	295 (93,7%)	20 (6,3%)	103 (32,7%)	93 (29,5%)	2 (0,6%)	117 (37,1%)
		Чувствительных (20)	545	143 (26,2%)	402 (73,8%)	36 (6,6%)	32 (5,9%)	139 (25,5%)

Примечание. * – полный перечень использованных вирусов представлен в табл. 1; ** – NA реассортантов всегда наследовался от дикого родительского вируса, принадлежность остальных генов варьировала; *** – формулы генома: 6:2 – NA и NA унаследованы от дикого родителя, 6 внутренних генов – от донора аттенуации; 5:3 – NA, NA и один из внутренних генов унаследованы от дикого родителя, 5 остальных внутренних генов – от донора аттенуации; 7:1 – NA унаследован от дикого родителя, все внутренние гены и NA – от донора аттенуации; [#] – среди проанализированных эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1) не были выявлены ИЧ-варианты; ^{##} – при реассортации использована предварительная инактивация дикого родителя ультрафиолетовым облучением; ^{###} – без учета результатов реассортации донора аттенуации с предварительно инактиванным диким родителем.

В качестве таких реассортантов были использованы штаммы, предоставляемые NIBSC в качестве компонентов сезонной ИГВ – реассортант IRV-148 на основе вируса А/Брисбен/59/2007 (H1N1) и реассортант NIB-64 на основе вируса А/Перт/16/2009 (H3N2).

При скрещивании IRV-148 и NIB-64 с донором аттенуации Л17 было получено соответственно 28 и 9 реассортантов (см. табл. 3). Было показано, что все 28 реассортантных штаммов, полученных на основе вируса IRV-148, унаследовали ген PB2 от донора аттенуации, а NA и NA – от дикого родительского штамма. Из 9 реассортантов вируса NIB-64 5 унаследовали ген PB2 от донора Л17, а NA и NA – от дикого вируса.

Таким образом, была продемонстрирована возможность разрыва связки генов PB2+NA у PR8-реассортантов, несущих NA и NA сезонных штаммов вируса гриппа. Вероятно, невозможность переноса в реассортантный штамм PB2-гена от донора аттенуации, а NA – от вируса гриппа птиц H5N1 является уникальной особенностью H5N1-PR8-вирусов.

Неудачная попытка получения ХА вакцинных штаммов H5N1 с формулой генома 6:2 методом классической реассортации не должна обескураживать. Возможно, формула генома 7:1 вакцинного штамма ЖГВ против высокопатогенных, пандемически опасных вирусов гриппа птиц сероподтипа А(H5N1) имеет

свои преимущества: присутствие в вакцинном штамме еще одного гена от донора аттенуации (NA) является дополнительной гарантией его безопасности. Кроме того, согласно общепризнанным представлениям [13–15],

Таблица 3

Принадлежность генов, кодирующих NA и PB2-белки реассортантов, полученных при скрещивании с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) вакцинных штаммов для ИГВ

Реассортантный вирус**, несущий NA и NA от дикого вируса, а внутренние гены – от вируса PR8	Реассортанты, полученные при скрещивании донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с PR8-реассортантами*						
	всего	число (%) реассортантов, унаследовавших указанный ген от того или иного родительского вируса**		принадлежность гена NA			
		принадлежность гена PB2	принадлежность гена NA	PR8	Л17***	дикий вирус	Л17
NIBRG-23 (H5N1) [#]	17	0	17 (100)	0	17 (100)		
	20	20 (100)	0	20 (100)	0		
INDO/05 (H5N1)	11	0	11 (100)	0	11 (100)		
VN1203 (H5N1)	28	0	28 (100)	0	28 (100)		
	14	14 (100)	0	14 (100)	0		
IRV-148 (H1N1)	28	0	28 (100)	28 (100)	0		
NIB-64 (H3N2)	9	4 (44,4)	5 (55,6)	9 (100)	0		

Примечание. * – NA реассортантов всегда наследовался от дикого родительского вируса, принадлежность генов PB1, PA, NP, M и NS варьировала; ** – вакцинный штамм для ИГВ, подготовленный на основе различных штаммов вируса гриппа А и донора высокой урожайности PR8; *** – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), донор аттенуации; [#] – в таблице суммированы результаты, полученные при скрещивании с донором аттенуации нативного и инактивированного УФО вируса.

именно антитела к НА вируса гриппа являются одним из важных компонентов протекции от вирусов гриппа человека и в значительно меньшей степени – к НА. Вирусы гриппа птиц H5N1 в этом отношении не являются исключением [16]. Так, вакцинация кур против высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 с помощью одного НА или в сочетании с НА вызывала в обоих случаях 100% защиту от челлендж-инфекции. Более того, включение НА в состав вакцинного препарата не усиливало высокий защитный эффект, обусловленный НА [17].

Выводы

1. Показано, что наиболее высокий процент получения реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ достигается при скрещивании доноров аттенуации с эпидемическими вирусами, устойчивыми к неспецифическим гаммаингибиторам.

2. Методами классического скрещивания вирусов H5N1-PR8 с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) не удалось получить реассортанты 6:2, содержащие НА и NA вирусов гриппа птичьего происхождения. Это может объясняться особенностями жесткой констелляции генов указанных вирусов.

3. Была выявлена прочная связь между генами PB2/PR8 и птичьей NA, которые всегда наследовались реассортантами вместе. Если же в геном реассортантного вируса включался ген PB2 донора аттенуации, NA также наследовалась от него.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа. Вопросы вирусологии. 1977; 4: 387–95.
2. Kiseleva I.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Larionova N.V., Dubrovina I.A., Berdygulova Zh.A. et al. Genome composition analysis of reassortant influenza viruses used in seasonal and pandemic live attenuated influenza vaccine. Mol. Gen. Mikrobiol. Virol. 2011; 26 (4): 174–85.
3. Методические указания МУ 3.3.2.1758–03. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. <http://rudoctor.net/medicine/bz-bw/med-antuh/index.htm>.
4. Киселева И.В. Основы аттенуации вируса гриппа: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2001.
5. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Литвинова О.М., Иванова В.В., Исакова И.Н., Медведева Т.Е. и др. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа. Медицинский академический журнал. 2002; 2 (3): 49–57.
6. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова И.Н., Литвинова О.М., Руденко Л.Г. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В разных лет выделения. Вопросы вирусологии. 2006; 5: 38–41.
7. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. J. Virol. 1998; 72 (8): 6373–80.
8. Gimsa U., Grötzinger I., Gimsa J. Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity. Virus Res. 1996; 42(1–2): 127–35.
9. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Mashin V.V., Krasilnikov I.V. et al. Comparative safety, immunogenicity, and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models (Testing of killed and live H5 vaccine). Influenza Other Respi. Viruses. 2012; 6 (3): 188–95.
10. Subbarao K., Webster R.G., Kawaoka Y., Murphy B.R. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? Virus Res. 1995; 39 (2–3): 105–18.
11. Lind P.E., Burnet F.M. Further studies of recombination between heat-inactivated virus and active virus. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1957; 35(6): 531–40.
12. Gottlieb T., Hirst G.K. The experimental production of combination

- forms of virus. VI. Reactivation of influenza viruses after inactivation by ultraviolet light. Virology. 1956; 2(2): 235–48.
13. Найхин А.Н. Противогриппозный иммунитет: отечественный вклад в изучение проблемы и перспективные направления развития исследований. Медицинский академический журнал. 2010; 4(10): 249–55.
14. Смородицев А.А. Грипп и его профилактика. М.; 1984.
15. Wilschut J.C., McElhaney L.E., Palache A.M., eds. Influenza. Amsterdam: Elsevier; 2006.
16. Gillim-Ross L., Subbarao K. Can immunity induced by the human influenza virus N1 neuraminidase provide some protection from avian influenza H5N1 viruses? PLOS Med. 2007; 4(2): 0226–8.
17. Nayak B., Kumar S., DiNapoli J.M., Paldurai A., Perez D.R., Collins P.L. et al. Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. J. Virol. 2010; 84(5): 2408–20.

REFERENCES

1. Alexandrova G.I. Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus. Voprosy Virusologii. 1977; 4: 387–95 (in Russian).
2. Kiseleva I.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Larionova N.V., Dubrovina I.A., Berdygulova Zh.A. et al. Genome composition analysis of reassortant influenza viruses used in seasonal and pandemic live attenuated influenza vaccine. Mol. Gen. Mikrobiol. Virol. 2011; 26(4): 174–85.
3. Manual on testing quality of immunobiological preparations for influenza prophylaxis and diagnostics (3.3.2.1758–03). <http://http://rudoctor.net/medicine/bz-bw/med-antuh/index.htm> (accessed 6 July 2012). (in Russian).
4. Kiseleva I.V. The basis of attenuation of influenza virus. Dr. biol. sci. diss. Saint Petersburg; 2001 (in Russian).
5. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Litvinova O.M., Ivanova V.V., Isakova I.N., Medvedeva T.E. et al. Change of temperature sensitivity as a reflection of evolutionary variability of wild-type influenza viruses. Med. Akad. J. 2002; 2(3):49–57 (in Russian).
6. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Isakova I.N., Litvinova O.M., Rudenko L.G. Naturally occurring temperature-sensitive strains of influenza B virus. Voprosy virusologii. 2006; 5: 38–41 (in Russian).
7. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. J. Virol. 1998; 72 (8): 6373–80.
8. Gimsa U., Grötzinger I., Gimsa J. Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity. Virus Res. 1996; 42(1–2): 127–35.
9. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Mashin V.V., Krasilnikov I.V. et al. Comparative safety, immunogenicity, and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models (Testing of killed and live H5 vaccine). Influenza Other Respi. Viruses. 2012; 6 (3): 188–95.
10. Subbarao K., Webster R.G., Kawaoka Y., Murphy B.R. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? Virus Res. 1995; 39 (2–3): 105–18.
11. Lind P.E., Burnet F.M. Further studies of recombination between heat-inactivated virus and active virus. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1957; 35(6): 531–40.
12. Gottlieb T., Hirst G.K. The experimental production of combination forms of virus. VI. Reactivation of influenza viruses after inactivation by ultraviolet light. Virology. 1956; 2(2): 235–48.
13. Naykhin A.N. Anti-influenza immunity: the contribution of Russian scientists to the research work and promising directions. Med. Akad. J. 2010; 4 (10): 249–55 (in Russian).
14. Smorodintsev A.A. Influenza and its prophylaxis. Moscow; 1984 (in Russian).
15. Wilschut J.C., McElhaney L.E., Palache A.M., eds. Influenza. Amsterdam: Elsevier; 2006.
16. Gillim-Ross L., Subbarao K. Can immunity induced by the human influenza virus N1 neuraminidase provide some protection from avian influenza H5N1 viruses? PLOS Med. 2007; 4(2): 0226–8.
17. Nayak B., Kumar S., DiNapoli J.M., Paldurai A., Perez D.R., Collins P.L. et al. Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. J. Virol. 2010; 84(5): 2408–20.

Поступила 04.07.12