

М.В. Сергеева, В.В. Кузнецов, М.А. Касьяненко, А. А. Шалджян, И.А. Репко, М.В. Потапчук, Ю.Р. Романова, Л.М. Цыбалова

Иммунизация живым аттенуированным вирусом гриппа А/Н5N1 защищает морских свинок от реинфекции

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

Холодоадаптированный вирус гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) получен как универсальный донор аттенуации и репродуктивности для вакцинных и производственных штаммов. Прототипы живых аттенуированных вакцин и инактивированных вакцин, подготовленные из реассортанта данного донора с поверхностными антигенами высокопатогенного вируса А/chicken/Astana/6/05 (H5N1), были изучены на морских свинках. Иммунизация обоими препаратами индуцировала одинаковый уровень сывороточных антител (АТ), однако уровень мукозальных АТ был значительно выше в группе животных, привитых живым вирусом. Только в этой группе отмечено полное подавление репродукции реинфицирующего вируса, что подтверждает наличие прямой зависимости защищенности от уровня местных АТ.

Ключевые слова: *инактивированная вакцина; живая вакцина; вирус гриппа H5N1; морские свинки.*

Immunization with live attenuated A/H5N1 vaccine protects guinea pigs from reinfection

M. V. Sergeeva, V. V. Kuznetsov, M. A. Kasianenko, A. A. Shaldzhan, I. A. Repko, M. V. Potapchuk, J. R. Romanova, L. M. Tsybalova

Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Cold-adapted influenza virus A/HK/1/68/162/35(H3N2) was developed as unified donor of attenuation and high reproductive capacity for vaccine strains. The reassortant of this donor with surface antigens of highly pathogenic strain A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) was tested in guinea pigs as a live or inactivated preparation. Immunization with both formulations induced equal levels of serum virus specific antibodies, while the level of mucosal antibodies was significantly higher in animals immunized with live virus. The challenge with the homologous virus demonstrated complete virus clearance only in this group, thereby indicating a direct correlation of the protection level with the level of mucosal antibodies.

Key words: *inactivated vaccine; live vaccine; Influenza H5N1; guinea pigs.*

Вакцинация является основным способом профилактики гриппозной инфекции. Наряду с инактивированными вакцинами (ИГВ) в отдельных странах используют живые аттенуированные вакцины (ЖГВ), которые представляют собой ослабленный вирус, вводимый интраназально (и/н). ЖГВ индуцирует выработку как антительного (секреторные и сывороточные АТ_а (АТ)), так и клеточного иммунного ответа. Иммуитет, вызванный этими вакцинами, является более длительным и кроссреактивным, чем иммуитет, вызванный инактивированными вирусными препаратами [5]. В настоящее время в мире лицензировано два холодоадаптированных (ХА) донора аттенуации: А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (в России) и А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) (в США), которые используют для получения вакцинных штаммов [1]. Оба донора характеризуются свойствами температурочувствительности (ts-) и холодоадаптированности (са-), которые служат маркерами безвредности для людей как самих доноров, так и полученных на их основе реассортантов.

Нами был получен ХА-штамм А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) (А/ГК/са), который также сочетает ts- и са- признаки, а кроме того, обладает высокой репродуктивной активностью в куриных эмбрионах (КЭ) – качеством, повышающим рентабельность производства как живых, так и инактивированных ИГВ [3]. Полученные нами на основе штамма А/НК/са реассортанты с поверхностными антигенами вирусов гриппа различных серотипов (H1N1, H3N2, H5N1, H3N8) наследовали его основные

свойства (высокая репродуктивность, ts- и са- фенотип) и были безвредными для мышей как при и/н, так и при внутримышечном (в/м) введении [2].

Цель данного исследования состояла в сравнении иммуногенных и защитных свойств экспериментальных препаратов живой вакцины и ИГВ, полученных из реассортанта, который содержит гены поверхностных белков птичьего вируса А/chicken/Astana/6/05 (H5N1) в комбинации с остальными генами донора А/НК/са на морских свинках, высоковосприимчивых к гриппозной инфекции и успешно используемых для оценки эффективности противогриппозных препаратов [8, 9, 18].

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали ХА-реассортант на основе штамма А/НК/са, содержащий гемагглютинин (НА) с модифицированным сайтом расщепления и нейраминидазу (НА) высокопатогенного вируса гриппа А/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) (формула генома 6:2), – штамм А/НК/Astana/6:2/2010 (H5N1) (Ast/НК) [16]; а также аналогичный реассортант вируса А/chicken/Astana/6/2005 (H5N1), созданный на основе донора А/PR/8/34 (PR8) методом обратной генетики (формула генома 6:2), – штамм А/Astana/RG/6:2/2009 (H5N1) (Ast/PR8) [10]. Полиосновной сайт расщепления НА был замещен последовательностью, характерной для низкопатогенных вирусов гриппа птиц [7]. Вирусы культивировали в 10–12-дневных КЭ при следующей температуре: оптимальной 32–34°C, пониженной 26°C или

Контактная информация:

Сергеева Мария Валерьевна, науч. сотр.; e-mail: maria_s@influenza.spb.ru

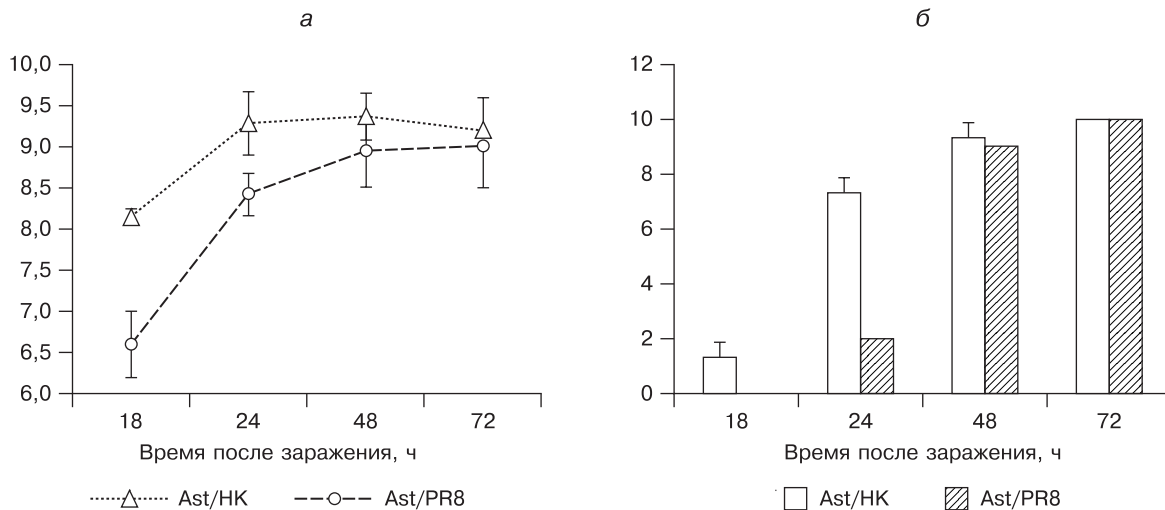


Рис. 1. Изменение в динамике роста инфекционной (в $\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$) (а) и гемагглютинирующей ($\log_2\text{TAE}$) активности (б) штаммов Ast/НК и Ast/PR8 при накоплении в КЭ.

Даны средние значения титров со стандартными отклонениями для трех независимых измерений. По горизонтали – время после заражения (в ч).

повышенной 39°C . Инфекционную активность вирусов определяли титрованием в КЭ, рассчитывая 50% эмбриональную инфекционную дозу ($\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$) по методу Reed–Muench [11]. Гемагглютинирующую активность определяли по стандартной методике с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Динамику репродукции вакцинных кандидатов изучили, измеряя инфекционную и гемагглютинирующую активность вирусов через 18, 24, 48 и 72 ч после заражения КЭ стандартной дозой $10^4\text{ЭИД}_{50}/\text{КЭ}$.

Морские свинки массой 500–600 г были получены из ФГУП питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН. Перед началом работы животных выдерживали в карантине вивария НИИ гриппа. В исследованиях руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977).

Подготовка вакцинных препаратов. Прототип ЖГВ содержал реассортант Ast/НК, разведенный фосфатно-солевым буфером (ФСБ) до концентрации $7\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$. Для подготовки прототипов ИГВ вирусы Ast/НК и Ast/PR8 накапливали в КЭ, осветляли, концентрировали, осадок ресуспендировали в ФСБ, содержащем $0,01\text{M MgSO}_4$, после чего очищали ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (20–60%). Вирусосодержащие фракции собирали, разводили указанным буфером, затем центрифугировали. Полученный осадок восстанавливали в указанном буфере и инактивировали 0,025% формалином. Содержание НА в препаратах очищенных вирусов оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией [14].

Иммунизацию морских свинок проводили однократно, без наркоза, каждая опытная группа состояла из 4 животных. 1-й группе животных и/н вводили по 200 мкл прототипа ЖГВ в оба носовых хода в дозе $6,6\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{животное}$. 2-й и 3-й группам в/м вводили 100 мкл соответствующего препарата ИГВ (Ast/НК или Ast/PR8) из расчета 10 мкг НА/животное. Контрольным животным в/м вводили ФСБ. Для оценки репродукции реассортанта Ast/НК в верхних дыхательных путях до вакцинации и на 2, 4, 7 и 10-е сутки после получения назальных смывов животных путем промывания носовых ходов 1 мл ФСБ, содержащего 200 мкг/мл ампициллина и 0,3% BSA (Sigma, США). Смывы замораживали, хранили при -70°C , затем титровали в КЭ.

Системный иммунный ответ оценивали по титру сывороточных АТ в реакциях торможения гемагглютинации (РТГА) с 1% лошадиными эритроцитами [16], ми-

кронейтрализации (РН) и иммуноферментного анализа (ИФА) [12] до и на 21-е сутки после вакцинации морских свинок. Местные IgG-АТ в носовых смывах животных определяли в ИФА.

Защитную эффективность препаратов оценивали по интенсивности репродукции заражающего вируса при реинфекции животных. Для реинфекции через 4 нед после вакцинации животным в каждый носовой ход вводили по 10 мкл вируса Ast/PR8 в дозе $5,27\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{животное}$. На 2, 4, 7 и 10-е сутки после реинфекции собирали назальные смывы и оценивали интенсивность репродукции вируса титрованием в КЭ.

Статистический анализ данных проводили в программном пакете GraphPad Prism v5.01 с использованием непараметрических критериев (Манна–Уитни, знаков-ых рангов Уилкоксона).

Результаты

При сравнении репродуктивной активности реассортантов Ast/PR8 и Ast/НК в КЭ при оптимальной температуре установили, что по этому признаку штаммы практически не отличались. Инфекционная активность достигала $9,5\text{--}9,7\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, а гемагглютинирующая – 1024 ГАЕ. Однако штамм Ast/НК значительно превосходил вирус Ast/PR8 по скорости роста в КЭ при стандартной заражающей дозе 10^4ЭИД_{50} (рис. 1).

Репродукция штамма Ast/НК в верхних дыхательных путях животных, получивших ХА-адаптированный препарат, наблюдалась в течение 7 дней, достигая максимального титра ($4,2\lg\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$) на 2-е сутки, после чего титр вируса снижался.

Через 3 нед после иммунизации во всех группах иммунизированных животных отметили достоверное повышение уровня системных антигемагглютинирующих, нейтрализующих и локальных (IgG) АТ по сравнению с уровнем АТ в контрольной группе ($p < 0,048$, критерий Уилкоксона для выборки и медианы) (рис. 2, а–в). При этом среднегеометрические значения титров системных АТ достоверно не отличались для трех групп животных, получивших живой или инактивированный препараты. Введение прототипа ЖГВ индуцировало образование локальных IgG, титры которых (СГТ = 26,9) достоверно превышали титры, обнаруженные у животных, которые получили прототипы ИГВ (СГТ = 5,7) (рис. 2, г).

При реинфекции штаммом Ast/PR8 у контрольных животных данный вирус выделялся из носовых смывов в те-

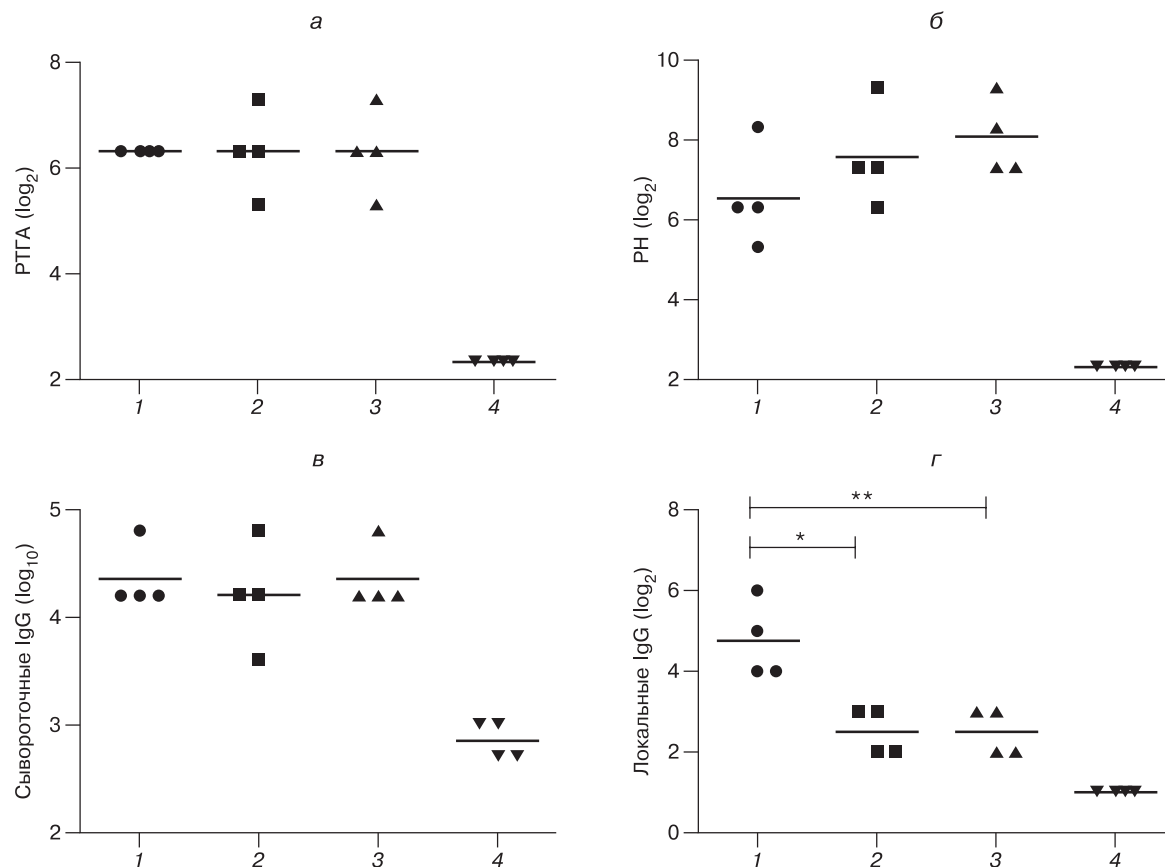


Рис. 2. Вирусспецифические АТ в сыворотках крови (а–в) и носовых смывах (г) морских свинок после иммунизации ЖГВ и ИГВ на основе соответствующих вакцинных штаммов.

Приведены индивидуальные значения титров АТ по данным РТГА (а), РН (б) и ИФА (в, г). Чертой отмечен среднегеометрический титр для каждой группы животных. *, ** $p=0,029$ (двусторонний критерий Манна–Уитни).

чение 7 сут после заражения. В группах морских свинок, иммунизированных прототипами ИГВ, зафиксировали сокращение срока выделения вируса до 4 сут, а также достоверное снижение его титра на 1,25–2,5 lgЭИД₅₀ по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных на 2-е и 4-е сутки после инфицирования. Вакцинация прототипом ЖГВ полностью предотвращала выделение вируса, использованного для реинфекции (рис. 3).

Обсуждение

В наших предыдущих исследованиях была показана безвредность для мышей прототипов ЖГВ и ИГВ, полученных из реассортантов разных серотипов на основе штамма А/НК/са. В данной работе мы сравнили иммуногенность и защитную эффективность прототипов ЖГВ и ИГВ, подготовленных из реассортантного штамма Ast/НК подтипа А/Н5N1 на морских свинках, высоковосприимчивых к инфекции вирусами гриппа разных серотипов, в том числе А/Н5N1 [18, 19].

В группе животных, иммунизированных прототипом ЖГВ, отметили полное подавление репродукции гомологичного вируса после реинфицирования в отличие от групп, иммунизированных инактивированными препаратами, где наблюдали лишь частичное снижение уровня и продолжительности выделения вируса. Аналогичный результат был продемонстрирован А. Lowen и соавт., которые показали, что иммунизация морских свинок инактивированным препаратом не предотвращала выделения вируса при реинфекции, а иммунизация живым вирусом, аттенуированным за счет транскрипирования NS-гена, вызвала «стерилизующий» иммунитет [9].

Защищенность морских свинок скорее коррелировала с уровнем вирусспецифических мукозальных IgG,

который был наивысшим в группе животных, иммунизированных прототипом ЖГВ, а не с уровнем нейтрализующих АТ, который достоверно не различался во всех группах вакцинированных животных. Необходимо отметить, что иммунизация живым вирусом также стимулирует клеточный иммунитет, который может играть дополнительную роль в обеспечении защищенности животных [5]. При вакцинации людей разница в эффективности живых и инактивированных противогриппозных препаратов менее выражена. Люди неоднократно подвергаются естественной гриппозной инфекции и в

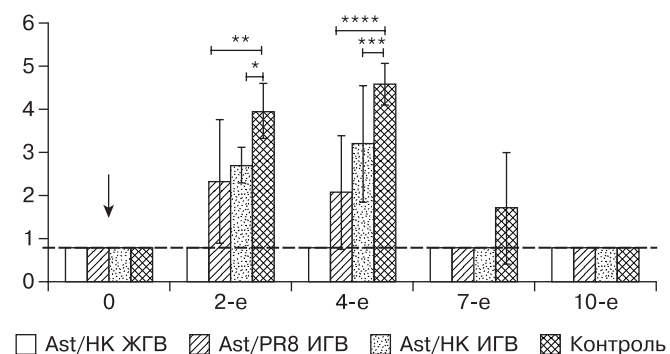


Рис. 3. Изменение в динамике выделения вируса из назальных смывов у контрольных и иммунизированных морских свинок после заражения гомологичным вирусом Ast/PR8.

Стрелкой отмечен день введения вируса. Приведены средние значения титров (в lg ЭИД₅₀/мл) по группам и стандартные отклонения. Нижний предел определения инфекционной активности составил 0,8 lgЭИД₅₀/мл. *, **, ***, **** $p<0,029$ (односторонний критерий Манна–Уитни). По оси абсцисс – сутки после инфицирования.

момент вакцинации могут иметь клетки памяти, которые стимулируются как ЖГВ, так и ИГВ [4].

Отрицательным моментом при иммунизации ЖГВ является активная репродукция вакцинного штамма в верхнем респираторном тракте, так как создает опасность распространения вируса и его генетического материала в популяции. Этот феномен отмечен для обеих лицензированных ХА-вакцин. Так, ХА-вакцинный штамм, полученный на основе низкопатогенного вируса гриппа птиц – А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), выделялся у привитых людей в течение 11 дней [13]. А в описании ХА-ЖГВ Flumist (США) отмечается, что вакцинный вирус может репродуцироваться до 21 дня. Ограничить репродукцию вакцинного штамма при сохранении защитных свойств возможно при использовании вакцинных кандидатов, аттенуированных за счет удаления NS1-гена [12].

Необходимо отметить, что показатели иммуногенности и защитной эффективности прототипов ИГВ, подготовленных из вакцинных кандидатов на основе стандартного донора PR8 и штамма А/НК/са, достоверно не различались. Интересно, что скорость накопления штамма Ast/НК в КЭ была значительно выше скорости накопления штамма Ast/PR8. Одним из возможных объяснений этого факта может служить различное функциональное соответствие генов реассортанта, например взаимодействие полимеразы PB1 штамма-донора с генными сегментами, кодирующими HA и NA гетерологичного птичьего вируса [6, 15].

Результаты проведенных испытаний на морских свинках прототипов ЖГВ и ИГВ, подготовленных из реассортанта Ast/НК, демонстрируют более высокую защитную эффективность препарата ЖГВ по сравнению с таковой ИГВ и подтверждают перспективность использования штамма А/Гонконг/1/68/162/35(H3N2) в качестве единственного донора для подготовки вакцинных и производственных реассортантов.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. М.: Наука; 1994. [Aleksandrova G.I., Klimov A.I. A live vaccine against influenza. Moscow: Nauka; 1994.] (in Russian).
2. Потачук М.В., Репко И.А., Сергеева М.В. и др. Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/Гонконг/1/68/162/35(H3N2). Вопросы вирусологии. 2012; 57 (6): 42–6. [Potapchuk M.V., Repko I.A., Sergeeva M.V. et al. Voprosy virusologii. 2012; 57(6): 42–6.] (in Russian).

3. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потачук М.В. и др. Характеристика холодадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности. Вопросы вирусологии. 2012; 57 (6): 13–7. [Tsybalova L.M., Gorev N.E., Potapchuk M.V. et al. Voprosy virusologii. 2012; 57(6): 13–7.] (in Russian).
4. Beyer W.E., Palache A.M., de Jong J.C., Osterhaus A.D. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis. Vaccine. 2002; 20: 1340–53.
5. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. Scand. J. Immunol. 2004; 59: 1–15.
6. Harvey R., Wheeler J.X., Wallis C.L. et al. Quantitation of haemagglutinin in H5N1 influenza viruses reveals low hemagglutinin content of vaccine virus NIBRG-14 (H5N1). Vaccine. 2008; 26: 6550–4.
7. Horimoto T., Takada A., Fujii K. et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. Vaccine. 2006; 24: 3669–76.
8. Kistner O., Howard M.K., Spruth M. et al. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. Vaccine. 2007; 25: 6028–36.
9. Lowen A.C., Steel J., Mubareka S. et al. Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. J. Virol. 2009; 83: 2803–18.
10. Nurpeysova A., Khairullin B., Kassenov M. et al. Preclinical testing of Kazfluvac, a vaccine against pandemic influenza A/H5N1v. J. Pharm. Biomed. Sci. 2011; 1: 108–12.
11. Reed L.I., Muench H. A simple method of estimation fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27: 493–7.
12. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M. et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. PLoS One. 2009; 4: e5984.
13. Rudenko L., Kailinsky A. Evaluation of Russian live attenuated vaccine H5N2 in clinical trials. http://www.who.int/entity/vaccine_research/diseases/influenza/160207_Rudenko.pdf (дата обращения 26.08.2012).
14. Rudneva I.A., Sklyanskaya E.I., Barulina O.S. et al. Phenotypic expression of HA-NA combinations in human-avian influenza A reassortants. Arch. Virol. 1996; 141: 1091–9.
15. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A. et al. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. Arch. Virol. 2007; 152: 1139–45.
16. Stephenson I., Wood J.M., Nicholson K.G. et al. Detection of anti-H5 responses in human sera by HI using horse erythrocytes following MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 vaccine. Virus Res. 2004; 103: 91–5.
17. Sultankulova K.T., Sandybayev N.T., Chervyakova O.V. et al. New recombinant strain A/HK/Astana/6/2/2010 for prophylaxis of A/H5N1 influenza. BTRB. 2012; 1: 5–14.
18. Sun Y., Bi Y., Pu J. et al. Guinea pig model for evaluating the potential public health risk of swine and avian influenza viruses. PLoS One. 2010; 5: e15537.
19. Van Hoesven N., Belsler J.A., Szretter K.J. et al. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. J. Virol. 2009; 83: 2851–61.

Поступила 17.09.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:578.828.61-092:612.017.1.0641-085.015.8

Н.Н. Зайцева, О.В. Парфенова, Е.И. Ефимов

Анализ распространенности резистентных штаммов ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе

ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород

Исследована распространенность мутаций первичной резистентности и резистентности на фоне приема высокоактивной антиретровирусной терапии (АРТ) у ВИЧ-инфицированных Приволжского федерального округа. Среди АРТ-наивных ВИЧ-позитивных пациентов мутаций, приводящих к развитию резистентности, не выявили. Среди лиц, получающих АРТ, отметили высокий уровень резистентности к ламивудину, невирапину, эфаверенцу. В целом частоту мутаций устойчивости к ингибиторам обратной транскриптазы нуклеозидным (23,8%) и нуклеозидным (26,9%) определяли чаще, чем к ингибиторам протеазы (1,2%).

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека; высокоактивная антиретровирусная терапия; резистентные штаммы ВИЧ.

Контактная информация:

Зайцева Наталья Николаевна (Zaytseva Natalia Nikolaevna), e-mail: prokaids@mail.ru; 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71