

*Забережный А.Д.<sup>1,2</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>, Воркунова Г.К.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>1</sup>, Костина Л.В.<sup>1</sup>, Норкина С.Н.<sup>1</sup>,  
Алипер Т.И.<sup>1,2</sup>, Непоклонов Е.А.<sup>3</sup>, Львов Д.К.<sup>1</sup>*

## Получение нового штамма - реассортанта вируса гриппа А/Н5N1 методом обратной генетики и анализ его биологических свойств

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>2</sup>ФГНБУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва; <sup>3</sup>Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), 107139, г. Москва

При помощи обратной генетики был получен реассортантный штамм вируса гриппа с целью дальнейшей разработки вакцины против высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц (ВГП) подтипа H5. Новый штамм recPR8-H5N1 имеет ген гемагглютинина (ГА) от высокопатогенного ВГП А/Курган/05/2005 (H5N1), выделенного на территории России, а остальные гены – от высокопродуктивного штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Штамм recPR8-H5N1 имеет характерную для H5 антигенную специфичность, высокую репродуктивную активность при культивировании в 12-суточных куриных эмбрионах (КЭ), вызывая их гибель в течение 36 ч. Структурных изменений в гене ГА после 5 пассажей на КЭ не обнаружено. Инактивированная эмульгированная вакцина, изготовленная в лаборатории на основе штамма recPR8-H5N1, защищала 1,5 месячных цыплят через 21 день после однократной вакцинации при контрольном заражении высокопатогенным вирусом А/Курган/05/2005 (H5N1). Заражение невакцинированных цыплят вирусом recPR8-H5N1 не вызывало клинических и патоморфологических проявлений болезни, вирус не обнаруживался в крови через 7 дней. При этом зарегистрирована специфическая сероконверсия на 14-й день после заражения. Таким образом, создан прототипный штамм recPR8-H5N1, который не вызывает болезни у птицы, имеет требуемую антигенную специфичность и накапливается с высокой эффективностью при культивировании.

Ключевые слова: *обратная генетика; вирус гриппа; реассортант; вакцина.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. Вопросы вирусологии. 2014; 59(6): 23–27.*

### Engineering by reverse genetics and characterization of the new re-assortant influenza virus strain H5N1

*Zaberezhnyi A. D.<sup>1,2</sup>, Grebennikova T. V.<sup>1</sup>, Vorkunova G. K.<sup>1</sup>, Yuzhakov A. G.<sup>1,2</sup>, Kostina L. V.<sup>1</sup>,  
Norkina S. N.<sup>1</sup>, Aliper T. I.<sup>1,2</sup>, Nepoklonov E. A.<sup>3</sup>, Lvov D. K.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Y.R. Kovalenko All-Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, 107139, Moscow, Russia

Reverse genetics was applied to engineering of the reassortant vaccine candidate strain against highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs) of the H5 subtype. The new strain recPR8-H5N1 contains the HA gene from the Russian HPAIV A/Kurgan/05/2005 (H5N1), the NA and internal genes from A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). The strain recPR8-H5N1 demonstrated the antigenic specificity (H5), high proliferation rate in 12 days chicken embryos, and was lethal for the embryos in 36 hours. An inactivated emulsified vaccine based on the strain recPR8-H5N1 elicited high antibody titers and protected 6-week-old chickens from lethal challenge with the HPAIV A/Kurgan/05/2005 (H5N1) on day 21 after single immunization. Infection of non-vaccinated birds with the strain recPR8-H5N1 did not cause any pathology, and the virus was not detected using PCR in blood and cloacal swabs on day 7 p.i. Specific weak seroconversion caused by infection with the strain recPR8-H5N1 was detected on day 14 p.i. As a result, a new influenza virus strain was obtained with modified properties.

Key words: *Reverse genetics; influenza virus, re-assortation, vaccine.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2014; 59(6): 23–27. (In Russ.)*

Грипп птиц представляет собой экономическую угрозу для птицеводства во всем мире. В случае вспышки гриппа птиц в неблагополучных хозяйствах уничтожается все поголовье в соответствии с предписаниями международных организаций, Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), а также с национальными ветеринарно-санитарными нормативами [1–3]. Вакцинированные куры при заражении высокопатогенными штаммами вируса гриппа птиц (ВГП) не болеют и в значительно меньшей степени выделяют вирус в окружающую среду [4, 5]. Для вакцинации кур применяют цельновирсионные инактивированные вакцины с добавлением масляного адьюванта [6]. Главным недостатком вакцинации является ее неспособность предотвратить репликацию полевых штаммов вируса в организме кур и

циркуляцию вируса в вакцинированном стаде [7, 8]. Это способствует эволюции ВГП за счет антигенного дрейфа в вирусном гемагглютинине (ГА), приводя к снижению эффективности вакцинации. Несмотря на применение современных адьювантов, которые увеличивают иммуногенность вакцин, главным условием эффективности вакцин против гриппа остается антигенное соответствие ГА у вакцинного и эпизоотического штаммов вируса. Тем не менее в вакцинах против высокопатогенного ВГП А/Н5 это условие не всегда соблюдается [9, 10]. Так, вакцина на основе двух штаммов вируса гриппа А/chicken/Hidalgo/232/1994 (H5N2) и А/turkey/Wisconsin/1968 (H5N9) оказалась низкоэффективной против эпизоотического высокопатогенного штамма ВГП А/Н5N1 из-за недостаточного антигенного соответствия ГА [11]. Таким образом, актуальной задачей является не только создание

**Накопление антигемагглютининов в сыворотках крови кур, вакцинированных препаратом на основе инактивированного штамма гесPR8-H5N1 (1-я группа). Контрольная (2-я) группа не вакцинирована**

Группа	№ птицы	До вакцинации		21-й день после вакцинации	
		титр в РТГА		титр в РТГА	
		H5N1	H1N1	H5N1	H1N1
1-я	1.1	1:4	1:2	1:512	1:2
	1.2	1:2	1:4	1:2048	1:4
	1.3	1:4	1:2	1:2048	1:4
	1.4	1:2	1:4	1:512	1:2
	1.5	1:4	1:4	1:1024	1:2
	1.6	1:4	1:4	1:1024	1:4
	1.7	1:4	1:2	1:512	1:4
	1.8	1:2	1:2	1:512	1:2
	1.9	1:2	1:2	1:512	1:2
	1.10	1:2	1:4	1:256	1:4
	1.11	1:4	1:2	1:512	1:4
	1.12	1:2	1:4	1:1024	1:4
	1.13	1:4	1:2	1:512	1:2
	1.14	1:2	1:4	1:1024	1:2
	1.15	1:4	1:4	1:256	1:4
	1.16	1:4	1:4	1:512	1:2
	1.17	1:4	1:2	1:256	1:4
	1.18	1:2	1:2	1:512	1:2
	1.19	1:2	1:2	1:512	1:4
	1.20	1:2	1:4	1:256	1:4
2-я	2.1	1:4	1:2	1:4	1:2
	2.2	1:4	1:2	1:4	1:2
	2.3	1:4	1:4	1:4	1:4
	2.4	1:4	1:2	1:4	1:2
	2.5	1:4	1:4	1:4	1:4
	2.6	1:4	1:4	1:4	1:4
Контрольные сыворотки					
Контроль + SS H5N1				1:512	1:2
Контроль + SS H1N1				1:2	1:256
Контроль - SN				1:2	1:2

вакцины против ВГП с требуемой антигенной специфичностью, но и возможность эту вакцину модифицировать, следуя изменениям в антигенных свойствах циркулирующих полевых штаммов. Если обратиться к опыту здравоохранения, для создания вакцин против пандемий гриппа ВОЗ собирает результаты антигенного и генетического анализа циркулирующих высокопатогенных штаммов, представленных участниками Глобальной системы надзора за гриппом (GISRS). После этого методами обратной генетики создаются штаммы кандидаты для вакцин, обладающие заданной антигенностью и аттенуированные по отношению к куриным эмбрионам [1, 12]. Аттенуация достигается посредством модификации сайта разрезания ГА высокопатогенного штамма. Модифицированный ген ГА соединяется вместе с 7 остальными генами, взятыми от штамма A/Puerto Rico/8/34 (PR8), и используется для трансфекции клеточных культур. Полученный инфекционный вирус представляет собой реассортант, сконструированный методами генетической инженерии. Он обладает требуемыми антигенными свойствами, сниженной вирулентностью, а также подобно штамму PR8 эффективно накапливается в куриных эмбрионах [12].

В настоящей работе мы применили данную стратегию для создания нового реассортантного вируса гриппа гесPR8-H5N1, имеющего ГА высокопатогенного штамма ВГП A/Курган/05/2005 (H5N1), выделенного на территории России. Исследованы репродуктивные, антигенные и вирулентные свойства нового реассортанта. Полученные результаты – это первый шаг в работе по конструированию вирусных штаммов-кандидатов для инактивированных вакцин с заданными антигенными свойствами.

### Материалы и методы

**Вирус.** В работе использовали штамм вируса гриппа A/Курган/05/2005 (H5N1), который был любезно предоставлен руководителем лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, академиком РАН, проф. Н.В.Кавериним. Вирус культивировали на 12-дневных беспатогенных (specific pathogen free – СПФ) куриных эмбрионах (КЭ). Определение инфекционной активности вируса гриппа проводили согласно МУЗ.3.2.1758-03. *Специфические сыворотки* были получены после вакцинации кур инактивированной эмульгированной вакциной против гриппа птиц типа А подтипа Н5 «Флупротект Н5» производства ФГУП «Ставропольская биофабрика».

**Плазмиды.** Система из 8 плазмид со вставками 8 генов (PB2, PB1, PA, NA, NP, NA, M, NS) вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) в плазмиде pHW2000 [13] была любезно предоставлена St. Jude Children's Research Hospital, Мемфис, США. Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали набор Qiagen Plasmid Midiprep Kit («Qiagen», США).

**Выделение РНК и ОТ-ПЦР.** Вирусную РНК выделяли с использованием тризола (Trizol Reagent, «Sigma», США), кДНК нарабатывали с использованием олигонуклеотидных праймеров: Vm-NA-1 (5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TG-3') и Vm-NS-890R (5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3'). Амплификацию проводили с использованием термоциклера Терцик («ДНК-Технология», Россия). Продукты ПЦР были проанализированы методом гелеэлектрофореза и очищены с помощью набора GeneJET Extraction Kit («Fermentas», Литва). Секвенирование гена ГА выполняли с применением праймеров 1R201: TGT GTC TTT TCC AGT ATG TCT TG; 2R1195: TGT CTG CAG CGT ACC CAC T; 3R1662: CTA GAG TTC TCT CAT TTT CC; 1F100: TTG CAT TGG TTA CCA TGC A; 2F943: GAT AAA CTC TAG TAT GCC ATT C; 5F1532:

GAA AGT GTA AGA AAC GGA AC. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера с помощью набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0. Copyright © 1997–2004) и программы SeqMan из пакета программ Lasergene (version 7.1.0. Copyright © 1993–2006).

**Клеточные культуры и трансфекция.** Культуру клеток MDCK выращивали на ростовой среде DMEM с добавлением 5% эмбриональной сыворотки KPC («Gibco», США). Коэффициент пересева – 1:5–1:6. Культуру клеток почки эмбриона человека 293T выращивали на ростовой среде Opti-MEM («Gibco») с добавлением 5% фетальной сыворотки теленка («Gibco», Москва) без антибиотиков. Коэффициент пересева – 1:4. Для транс-

фекции клеток 293Т/МДСК использовали реагент TransIT®-LT1 Transfection Reagent («MirusBio», США). Заражение суточного клеточного монослоя МДСК проводили путем адсорбции вирусосодержащей культуральной жидкости, отобранной после трансфекции, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> («SANYO», Япония). Через 1 ч после адсорбции с монослоя клеток удаляли культуральную жидкость и заменяли на среду DMEM, содержащую 1 мкг/мл трипсина TPCK («Sigma», США) без сыворотки в течение 72 ч. Проводили контроль под микроскопом состояния монослоя на наличие цитопатического действия (ЦПД).

**Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.** Для заражения рекомбинантным ВГП H5N1 использовали 12-дневные СПФ-КЭ («Lohman», Германия). Для предотвращения бактериального заражения применяли антибиотики широкого спектра действия (стрептомицин и пенициллин 1000 ед/мл). Эмбрионы заражали в аллантоисную полость по 0,1 см<sup>3</sup> вирусосодержащей культуральной жидкости, отобранной после трансфекции (при дальнейшем пассировании – аллантоисной экстраэмбриональной жидкостью) в разведении 1:100–1:1000 (для последних пассажей использовали до 1:1 000 000) и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Эмбрионы просматривали через 6, 8, 12, 24, 48 ч после заражения под овоскопом. Погибшие эмбрионы охлаждали, помещая в холодильник при 4–6°C, вскрывали в асептических условиях и собирали экстраэмбриональную жидкость для последующей работы.

**Постановка реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА).** Реакции проводили на иммунологических планшетах с V-образными лунками с 1% суспензией куриных эритроцитов согласно рекомендациям МЭБ «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals», 2012. Сыворотки крови исследовали в РТГА с антигенами ВГП H5N1 собственного приготовления и H1N1 производства Покровского завода биопрепаратов. В качестве контроля использовали серонегативную сыворотку кур (SN), гипериммунную сыворотку кур (SS) к ВГП H5N1 и положительную (SS) сыворотку к ВГП H1N1 (табл. 1).

Накопление, а также идентификация рекомбинантного вируса H5N1 в процессе пассирования были продемонстрированы с помощью количественной тест-системы для обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени («Ветбиохим», Москва).

**Проверка антигенной активности вируса и проведение биопробы на птице.** Инактивированный формалином (в конечной концентрации 0,1%) вирус гесPR8-H5N1 после 3 пассажей в КЭ использовали для приготовления эмульсионной вакцины с готовым адъювантом Montanide ISA 70 («Seppic», Франция). Вакцинировали 1,5-месячных цыплят кросса Huxex white однократно подкожно в области средней трети шеи в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Птиц разделили на 4 группы (табл. 2): опытную (1-ю) группу (n = 20) и 3 контрольных группы 2, 3, 4-ю (n = 6 в каждой). Вакцинировали птиц опытной группы, контрольные группы не вакцинировали. Перед опытом и через 21 сут после вакцинации у птиц 1-й и 2-й групп брали пробы сывороток крови для серологических исследований (см. табл. 1). Через 21 сут после вакцинации птиц 1-й группы и 3-й контрольной группы заражали вирулентным высокопатогенным вирусом А/Курган/05/2005 (H5N1) орально в дозе 1•10<sup>7</sup>

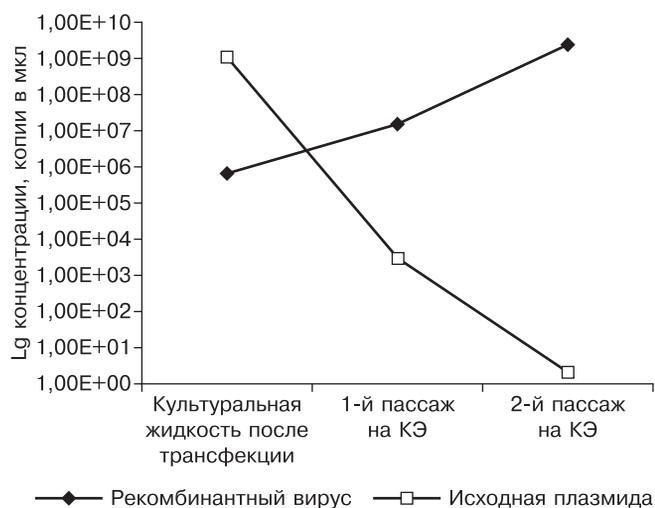
Схема постановки опыта на птице и результаты экспериментального заражения

Группа	n	Вакцинация	Заражение	n павших
1-я опытная	20	Инактивированный гесPR8-H5N1	А/Курган/05/2005 (H5N1)	0
2-я контрольная	6	Не вакцинировали	Не заражали	0
3-я контрольная	6	То же	А/Курган/05/2005 (H5N1)	6
4-я контрольная	6	" "	гесPR8-H5N1	0

ЭИД<sub>50</sub>. Птиц из 4-й контрольной группы заразили исследуемым гесPR8-H5N1 аналогичным методом.

### Результаты

**Получение реассортантного вируса гриппа гесPR8-H5N1 и оценка его репродуктивной активности.** Рекомбинантный штамм был получен при помощи трансфекции смеси клеток 293Т/МДСК смешанной ДНК 8 плазмид с последующим культивированием в перевиваемой культуре клеток МДСК, а затем в КЭ. На рисунке показана первая детекция инфекционного вируса гриппа после внесения ДНК в культуру клеток и последующее накопление вируса в аллантоисной жидкости КЭ. Плазмидная ДНК, содержащая ген H5, определялась лишь в культуральной жидкости после трансфекции и не обнаруживалась после первого пассажа. Число копий плазмидной ДНК подсчитано по результатам прямой ПЦР в реальном времени (калибровочные графики не приводятся). Для оценки репродуктивной активности вируса гесPR8-H5N1 провели 5 последовательных пассажей на КЭ. Специфическую гибель зараженных КЭ наблюдали через 36 ч после инъекции. После охлаждения собирали экстраэмбриональную жидкость и исследовали в РГА. В табл. 3 приведены показатели накопления ГА вируса в КЭ по результатам РГА. При небольшом разбросе значений титры в РГА в ходе культивирования возрастали, достигая средних значений 9,38 log<sub>2</sub>, 10,71 log<sub>2</sub>, 11,12 log<sub>2</sub> после 3, 4 и 5 пассажей соответственно. Параллельно провели 4 пассажа вируса на 24 ч в монослое линии клеток МДСК (табл. 4). Специфическое ЦПД наблюдали в течение 48–72 ч после заражения клеток. Титры в РГА были ниже и составили 5,66 log<sub>2</sub> для 3-го пассажа и 6,66 log<sub>2</sub> для 4-го пассажа. Увеличение титров ГА является подтверждением инфекционности вируса гесPR8-H5N1 и свидетельствует о его адаптации к используемой системе культивирования.



Накопление рекомбинантного вируса H5N1 в процессе культивирования и детекция плазмиды pHW2000 со вставкой гена ГА вируса гриппа А/Курган/05/2005 (H5N1).

Таблица 3

Гемагглютинирующая активность вируса гриппа штамма *recPR8-H5N1* в аллантоисной жидкости КЭ после 3, 4 и 5-го пассажей при заражении КЭ вирусом в разведениях  $10^{-4}$ – $10^{-6}$

№ эмбриона	Пассаж	Степень разведения вируса ( $10^n$ )	Титр РГА
1	3-й	-4	1:1024
2		-4	1:512
3		-5	1:512
4		-5	1:1024
5		-5	1:512
6		-6	1:512
7		-6	1:512
8		-6	1:1024
9	4-й	-5	1:2048
10		-5	1:1024
11		-5	1:2048
12		-6	1:2048
13		-6	1:2048
14		-6	1:1024
15		-6	1:2048
16	5-й	-5	1:2048
17		-5	1:4096
18		-5	1:2048
19		-5	1:1024
20		-6	1:2048
21		-6	1:1024
22		-6	1:2048
23		-6	1:8196

Проверка генетической стабильности штамма *recPR8-H5N1*. Проведено секвенирование гена ГА штамма *recPR8-H5N1* после 5 пассажей в КЭ, а также сравнение с первичной структурой ДНК исходной плазмиды рНВ2000 со вставкой гена ГА из штамма А/Курган/05/2005 (H5N1). При сравнении не выявлено ни одной нуклеотидной замены в последовательности из 1782 нуклеотидов. Это свидетельствует и о стабильности антигенных эпитопов, связанных с геном ГА.

Проверка антигенной активности штамма *recPR8-H5N1*. На основе рекомбинантного штамма была изготовлена эмульсионная инактивированная вакцина, которой были иммунизированы птицы опытной группы. Данные, табл. 1 свидетельствуют о том, что через 21 день после вакцинации у кур вырабатываются антитела, специфичные к антигену Н5, в титрах  $8$ – $11 \log_2$  по результатам РТГА. При этом выработка антител, специфичных к антигену Н1, не превышает фоновых значений, характерных для контрольной группы.

Таблица 4

Гемагглютинирующая активность вируса гриппа штамма *recPR8-H5N1* в культуре MDCK после 3-го и 4-го пассажей при заражении клеток вирусом в разведениях  $10^{-2}$ – $10^{-6}$

№ препарата	Пассаж	Степень разведения вируса ( $10^n$ )	Титр РГА
1	3-й	-4	1:128
2		-5	1:64
3		-6	1:16
4	4-й	-2	1:256
5		-3	1:64
6		-4	1:64

Таблица 5

Сероконверсия и детекция вируса в крови и клоакальных смывах у птиц через 7–14 сут после заражения вирусом *recPR8-H5N1* (4-я группа). 2-я группа не имела контакта с вирусом

Группа	№ птицы	Титр антител к H5N1 в РТГА		Выявление вируса в ПЦР	
		7-е сутки	14-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
2-я	2.1	1:2	1:2	Нет	Нет
	2.2	1:2	1:2	"	"
	2.3	1:4	1:4	"	"
	2.4	1:2	1:2	"	"
	2.5	1:4	1:4	"	"
	2.6	1:2	1:2	"	"
4-я	4.1	1:2	1:16	"	"
	4.2	1:2	1:8	"	"
	4.3	1:4	1:64	"	"
	4.4	1:2	1:32	"	"
	4.5	1:4	1:128	"	"
	4.6	1:2	1:64	"	"

Заражение вакцинированных и контрольных птиц вирусами гриппа. Заражение птиц проводили через 21 день после начала опыта (вакцинации). Результаты представлены в табл. 2. После заражения высокопатогенным вирулентным вирусом А/Курган/05/2005 (H5N1) привитые инактивированной вакциной куры в течение срока наблюдения (14 сут) остались живыми без проявления клинических и патоморфологических признаков заболевания, как и птицы 2-й контрольной группы. Невакцинированные птицы 3-й контрольной группы погибли в пределах 3 сут после заражения. Птицы 4-й контрольной группы, зараженные полученным реассортантом *recPR8-H5N1*, в течение срока наблюдения оставались живыми и клинически здоровыми. Через 7 и 14 сут после заражения у этих кур, а также у птиц 2-й контрольной группы брали пробы сывороток крови и клоакальные смывы для изучения сероконверсии и детекции вируса в ПЦР. Результаты представлены в табл. 5. На 14-е сутки после заражения отмечена слабая сероконверсия у птиц 4-й группы. Титры в РТГА достигали среднего значения  $5,1 \log_2$  при фоновых значениях  $1,3 \log_2$  во 2-й незараженной группе. Вирус не был обнаружен методом ПЦР ни в крови, ни в клоакальных смывах.

### Обсуждение

Эффективность вакцинации в значительной степени зависит от антигенного сходства между полевыми и вакцинными штаммами вируса гриппа. Антигенные различия могут существенно снизить защитный эффект, что приведет к повышенному вирусовыделению у вакцинированной птицы или к вспышкам болезни. В настоящее время ВГП А/H5N1 согласно классификации ВОЗ/МЭБ/ФАО, принятой в 2011 г., разделен на 12 подгрупп на основе филогенетического анализа гена ГА. Такая генетическая диверсификация, вызванная постоянной эволюцией вируса, несомненно влечет за собой и антигенную диверсификацию. При помощи моноклональных антител была проведена классификация ВГП А/H5N1 по их антигенной специфичности [14]. Анализ высокопатогенных изолятов ВГП H5N1, полученных в период с 2002 по 2007 г. в Азии, позволил выделить 4 антигенные подгруппы. Таким образом, весьма важно обеспечить точное соответствие антигенной структуры вакцинного и эпизоотического штаммов ВГП. КЭ повсеместно используют для производства антигенов ВГП с целью разработки вакцин.

Однако высокопатогенные штаммы ВГП вызывают быструю гибель эмбрионов. Решить эту проблему можно путем конструирования штаммов ВГП со сниженной вирулентностью и заданной антигенной специфичностью при помощи обратной генетики.

В настоящей работе с использованием метода обратной генетики был получен реассортантный штамм вируса гриппа с целью дальнейшей разработки вакцины против высоко патогенных штаммов ВГП подтипа H5. Новый штамм геСР8-H5N1 имеет ген ГА от высокопатогенного ВГП А/Курган/05/2005 (H5N1), выделенного на территории России, а остальные гены – от высокопродуктивного штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Штамм геСР8-H5N1 имеет антигенную специфичность, характерную для подтипа H5, возрастающую репродуктивную активность при пассировании в культуре клеток и 12-суточных КЭ, вызывая гибель последних в течение 36 ч. Опытная инактивированная эмульгированная вакцина, изготовленная в лаборатории на основе штамма геСР8-H5N1, защищала 1,5-месячных цыплят при контрольном заражении высокопатогенным вирусом А/Курган/05/2005 (H5N1). Заражение цыплят вирусом геСР8-H5N1 не вызвало клинических и патоморфологических проявлений болезни, вирус не обнаруживался в крови через 7 дней. При этом зарегистрирована незначительная специфическая сероконверсия на 14-е сутки после заражения. Таким образом, создан прототипный штамм ВГП геСР8-H5N1, который не вызывает заболевания у птицы, имеет требуемую антигенную специфичность и накапливается с высокой эффективностью при культивировании. Следующим шагом в данной работе должна стать модификация гена ГА у штамма геСР8-H5N1 с целью снизить его вирулентность для КЭ с последующим детальным изучением нового штамма в качестве вакцинного кандидата. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения обратной генетики для быстрого конструирования реассортантов ВГП с заданной антигенной специфичностью с целью разработки вакцины, адекватной текущей эпизоотической ситуации.

#### ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Capua I., Marangon S. The use of vaccination to combat multiple introductions of Notifiable Avian Influenza viruses of the H5 and H7

- subtypes between 2000 and 2006 in Italy. *Vaccine*. 2007; 25:4987–95.
2. Food and agriculture organization. 2011. Approaches to controlling, preventing and eliminating H5N1 highly pathogenic avian influenza in endemic countries [cited 2011]. Available at: <http://www.fao.org/docrep/014/i2150e/i2150e00.htm>.
3. World organization for animal health. 2013. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (TYPE H5 and H7) [cited 2013]. Available at: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2013/>.
4. Savill N. J., St Rose S. G., Keeling M. J., Woolhouse M. E. Silent spread of H5N1 in vaccinated poultry. *Nature*. 2006; 442:757.
5. Swayne D. E., Kapczynski D. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunol. Rev.* 2008; 225:314–31.
6. World organization for animal health. 2012. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013, Chapter 2.3.4. [cited 2012 May]. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf).
7. Grund C., Abdelwhab el S. M., Arafa A. S., Ziller M., Hassan M. K., Aly M. M. et al. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. *Vaccine*. 2011; 29: 5567–73.
8. Lee C. W., Senne D. A., Suarez D. L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.* 2004; 78: 8372–81.
9. Soda K., Sakoda Y., Isoda N., Kajihara M., Haraguchi Y., Shibuya H. et al. Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn. J. Vet. Res.* 2008; 55: 93–8.
10. Uchida Y., Takemae N., Saito T. Application of reverse genetics for producing attenuated vaccine strains against highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 2014; May 8. PubMed PMID: 24805906.
11. Jadhao S. J., Lee C. W., Sylte M., Suarez, D. L. Comparative efficacy of North American and antigenically matched reverse genetics derived H5N9 DIVA marker vaccines against highly pathogenic Asian H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Vaccine*. 2009; 27: 6247–60.
12. World Health Organization. 2005. WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics [cited 2005 June]. Available at: [http://www.who.int/influenza/resources/documents/vaccine\\_ref\\_viruses\\_reverse\\_genetics/en/](http://www.who.int/influenza/resources/documents/vaccine_ref_viruses_reverse_genetics/en/).
13. Hoffmann E., Krauss S., Pérez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002; 20 (25–26): 3165–70.
14. Wu W. L., Chen Y., Wang P., Song W., Lau S. Y., Rayner J. M. et al. Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007. *J. Virol.* 2008; 82: 1798–807.

Поступила 29.05.14  
Received 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 578.832.1:578.74].083.2

Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Соминина А.А., Писарева М.М., Комиссаров А.Б., Кошелева А.А., Грудинин М.П.

## Эпитопный анализ молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии

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

Разработана панель моноклональных антител (МКА) к гемагглюнину вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии, обладающих выраженной вируснейтрализующей активностью. В целях идентификации вируснейтрализующих эпитопов получены эскейп-мутанты (ЭМ) вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 пассированием в присутствии этих МКА. Три из полученных ЭМ имели одиночные, два – двойные и один – тройную замены аминокислот в молекуле HA1 (H122N, A202E, K203T, K203I, K203N или A317V). Кроме того, у трех ЭМ выявлена замена N197S. Обсуждается связь выявленных замен с особенностями реагирования ЭМ с МКА в реакции торможения гемагглютинации.

Ключевые слова: вирусы гриппа В; моноклональные антитела; эскейп-мутанты; молекула гемагглютинина; эпитопное картирование.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(6): 27–31.

Для корреспонденции: Сорокин Евгений Валентинович, ст. науч. сотр. лаб. биотехнологии диагностических препаратов, e-mail: esorokin@rambler.ru

Correspondence to: Evgeniy Sorokin, senior scientist biotechnology diagnostic products, e-mail: esorokin@rambler.ru