

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.
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/.
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

Epitope analysis of the hemagglutinin molecule of the Victoria lineage influenza B viruses

Sorokin E. V., Tsareva T. R., Somnina A. A., Pisareva M. M., Komissarov A. B., Kosheleva A. A., Grudin M. P.

Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia

A panel of five monoclonal antibodies (MAbs) to the HA1 molecule of the influenza B virus of the Victorian lineage with high virus-neutralizing activity was developed. For identification of the virus neutralizing epitopes in HA1 escape mutants (EM) of the influenza B/Shandong/07/97 and B/Malaysia/2506/04 virus were selected using virus-neutralizing antibodies (MAbs). Three EMs had single, two – double and one – triple amino acid substitutions (AAS) in HA1 (H122N, A202E, K203T, K203I, K203N or A317V). In addition, AAS N197S was detected in three EMs. A correlation of AAS identified with peculiarities of interaction of EMs with MAbs was discussed.

Key words: influenza B viruses; monoclonal antibodies; escape mutants; hemagglutinin molecule; epitope mapping.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6): 27–31. (In Russ.)

Введение

Вирусы гриппа типа В, впервые выделенные в 1940 г., в течение длительного времени составляли одну весьма гетерогенную группу возбудителей. Начиная с 1983 г. наметился дивергентный характер их эволюции с формированием двух эволюционных линий, родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 [1–3], резко отличающиеся по антигенным и генетическим свойствам и периодически (в разные эпидемические сезоны) сменяющие друг друга в циркуляции, что создает серьезные трудности при выборе штаммов для включения в состав гриппозных вакцин [4]. Установлено [5], что в результате естественного иммунопрессинга в пределах линий происходит постоянный антигенный дрейф, обусловленный мутациями в тяжелой субъединице гемагглютинина (HA1). Согласно современным представлениям, Викторианская эволюционная линия (ЭЛ) разделилась далее на две генетически независимые сублинии, а Ямагатская – на четыре [5]. Информацию о механизмах антигенного дрейфа получают путем сравнения аминокислотного состава гемагглютинина природных изолятов и эскейп-мутантов (ЭМ), получаемых в лабораторных условиях в результате клонирования вирусов в присутствии моноклональных антител (МКА). Наблюдаемые в ходе естественной эволюции аминокислотные замены локализованы преимущественно в определенных локусах HA1, представляющих антигенные эпитопы этого белка. Интересно, что в этих же участках обычно происходят аминокислотные замены и у полученных в лабораторных условиях ЭМ.

В задачу настоящего исследования входила разработка МКА, направленных к HA1 вирусом гриппа В Викторианской ЭЛ с последующим получением ЭМ вируса и идентификацией иммунодоминантных сайтов в составе молекулы гемагглютинина.

Материалы и методы

Моноклональные антитела (МКА). МКА к вирусам гриппа типа В были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу [6] в нижеследующей модификации. Мышей линии BALB/c иммунизировали путем введения внутривенно 70 мкг очищенных ультрацентрифугированием вирусом гриппа В/Шандонг/07/97 или В/Малайзия/2506/04. Спустя 3 мес мышей бустировали очищенной фракцией поверхностных гликопротеинов (ГП) тех же вирусов (15 мкг). Через 3 дня проводили гибридизацию спленоцитов иммунных мышей с клетками миеломы P_х Ag. 653 в соотношении 10:1 в присутствии 50% раствора ПЭГ-2000 в среде Игла D-MEM. Первичный отбор клонов проводили по детекции антител (АТ) в иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием для сенсibilизации планшет фракции ГП вируса с по-

следующим поэтапным внесением исследуемых культуральных жидкостей и, затем, – пероксидазных конъюгатов АТ к IgG мыши (Sigma, США). Отобранные клоны гибридом, культивируемые в среде НАТ, подвергали 5-кратному реклонированию. Стабильные клоны – продуценты МКА криоконсервировали, а также использовали для получения асцитов.

Селекция эскейп-мутантов (ЭМ). В целях получения ЭМ использовали ранее описанный метод [7]. Для этого вирусы дикого типа (В/Шандонг/07/97 или В/Малайзия/2506/04) смешивали с равным количеством взятых в избыточной концентрации специфических МКА к указанному вирусам. Смеси инкубировали 1 ч при 37°C, после чего вводили в куриные эмбрионы (КЭ). Через 72 ч аллантоисные жидкости исследовали в РГА. Пробы, содержащие ЭМ вируса, подвергали реклонированию методом предельных разведений, после чего исследовали их способность реагировать в реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) с панелью МКА, включая гомологичные.

РТГА проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ. МКА титровали в объеме 50 мкл на 0,1 М ФСБ, после чего вносили 50 мкл вирусной суспензии, содержащей 4 АЕ вируса. После инкубации смеси в течение 1 ч в планшеты вносили по 100 мкл 1% суспензии эритроцитов.

ИФА. Планшеты для ИФА («Медполимер») сенсibilизировали в течение 18 ч при 4°C очищенным вирусом гриппа в концентрации 1 мкг/мл. В отмытые планшеты вносили разведения МКА на 0,1 М ФСБ, pH 7,2, содержащего 0,5% желатин и 0,05% твина-20 (ФСБ-Ж-Т). После взаимодействия МКА с вирусом в течение 1 ч при 37°C планшеты отмывали 3 раза ФСБ-Т и вносили пероксидазный конъюгат АТ к IgG мыши (Sigma, США), разведенный 1:10 000 на ФСБ-Ж-Т, с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. Затем в отмытые планшеты вносили смесь 3,3',5,5' тетраметилбензидаина (0,1 мг/мл) и 0,003% перекиси водорода на 0,1 М ацетат-цитратном буфере, pH 5. Реакцию останавливали 2 N серной кислотой. Результат учитывали на иммуноферментном анализаторе Anthos 2040 (Австрия) при длине волны 450 нм.

Молекулярно-генетический анализ. Выделение РНК вирусом гриппа В осуществляли с помощью набора QIAampViral RNA Mini Kit («Qiagen», США). Обратную транскрипцию РНК проводили в течение 40 мин при 37°C со случайными гексамерными праймерами с применением коммерческого набора «Реверта-Л» (ЦНИИЭ, Россия). Для амплификации использовали полимеразу ДиаТак («Интерлабсервис», Россия). Прямое секвенирование выполняли с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) с применением генетического анализатора GA3130 (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

Характеристика МКА, использованных в исследовании. В целях идентификации вируснейтрализующих эпитопов в молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа типа В Викторианской ЭЛ мы разработали панель из пяти МКА к вирусам гриппа, в том числе два к вирусу В/Шандонг/07/97 (5В7 и В/4Н1) и три – к штамму В/Малайзия/2506/04 (9С1, 9F1 и 11F8). Согласно данным western-блотта все они были направлены к HA1. Все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (10^6) и РТГА (1: 5120–1: 20 480) с вирусами Викторианской ЭЛ при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ и штаммами ранних (1954–1983 гг.) лет выделения. Все они обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса. Вместе с тем МКА отличались по спектру реагирования в РТГА. Так, если МКА В/4Н1, 9F1, 11F8 и 9С1 реагировали с различными вирусами Викторианской линии 1997–2011 гг. выделения и были направлены, по-видимому, к относительно консервативным сайтам в составе HA1, то МКА 5В7 выявляли изменчивый сайт, который был утрачен у ряда исследованных изолятов 2011 г., хотя и сохранился в составе других вирусов того же периода изоляции (табл. 1).

Выявление вируснейтрализующих эпитопов в молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04. Известно, что получение ЭМ, ре-

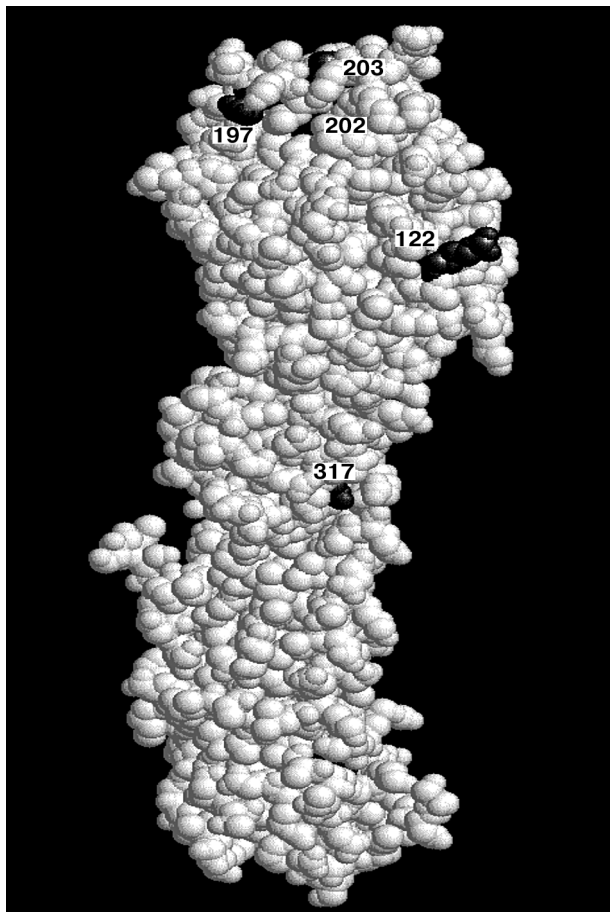
зистентных к действию вируснейтрализующих МКА, является ценным инструментом в изучении изменчивости антигенной структуры гемагглютинаина и идентификации иммунодоминантных эпитопов в составе HA1. Использование МКА позволяет определить, является ли антигенная детерминанта вирусного белка, с которой они взаимодействуют, индуктором синтеза вируснейтрализующих АТ. Полученные с использованием МКА ЭМ имеют, как правило, одну или две, реже три нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены [8]. При этом в РТГА с ЭМ в сравнении с исходным вирусом наблюдается 8–32-кратное и более снижение титров МКА, использованных для селекции. Мы получили ряд ЭМ, резистентных к вируснейтрализующему действию каждого из типов МКА, за исключением МКА 9С1, что может быть объяснено высокой активностью данных МКА, полностью нейтрализовавших репродукцию вируса.

В настоящее время в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В выделяют четыре антигенно значимых домена – петля 120 и прилегающие регионы HA1 (116–137), петля 150 HA1 (141–150), петля 160 HA1 (162–167), а также спираль 190 HA1 (194–02) и окружающие ее области [9]. Установлено [10], что эта молекула содержит шесть антигенных сайтов: ВА (положения 136, 137, 141, 146, 147, 148, 149, 150, 154), ВВ1 (положения 194, 195, 196, 197, 199, 200, 205, 206), ВВ2 (положения 162, 162а-с, 163, 164, 165), ВС (положения 47, 48, 80, 81, 116,

Таблица 1

Спектр реагирования МКА 5В7, В/4Н1, 9F1, 11F8 и 9С1 с различными штаммами вируса гриппа В Викторианской линии в РТГА

Эволюционная линия	Штамм	Титр ¹ МКА				
		5В7	В/4Н1	9F1	11F8	9С1
До разделения на линии	В/Грэйт Лэйк/54	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Сингапур/222/79	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/СССР/100/83	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Ямагатская линия	В/Ямагата/16/88	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Панама/45/90	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Пекин/184/93	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Харбин/07/04	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/С-Петербург/210/95	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Липецк/3/97	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Н.Новгород/348/97	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Яманаши/166/98	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/Флорида/07/04	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	В/ Флорида /04/06	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Викторианская линия	В/Шандонг/07/97	640	20480	20480	320	20480
	В/Малайзия/2506/04	640	20 480	20 480	640	20 480
	В/Брисбэн/60/08	320	20 480	20 480	640	20 480
	В/Краснодар/7/11	< 20	20 480	20 480	320	5120
	В/ Краснодар /12/11	< 20	20 480	20 480	2560	10 240
	В/ С-Петербург /130/11	320	1280	20 480	1280	20 480
	В/ С-Петербург /132/11	1280	20 480	20 480	2560	10 240
	В/ С-Петербург /144/11	< 20	5120	20 480	640	10 240
	В/ С-Петербург /177/11	< 20	20 480	20 480	640	20480
	В/Екатеринбург/7/11	< 20	20 480	20 480	2560	10 240
В/ Екатеринбург /9/11	40	10 240	20 480	1280	10 240	
В/ Екатеринбург /10/11	1280	20 480	20 480	2560	20 480	
В/Омск/2/11	<20	2560	20 480	<20	20 480	



Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вирусов гриппа В Викторианской линии.

Трехмерная модель молекулы HA1 построена на основе кристаллической структуры ГА вируса гриппа В/Гонконг/8/73, PDB code: 3BT6, с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2.

276, 281), BD (положения 121, 122, 125, 126, 127, 129, 179, 180, 181, 248, 249, 252-255) и BE (положения 56, 58, 68, 69, 71, 73, 75, 76). В наших исследованиях обнаружено, что ряд ЭМ, отобранных с помощью МКА, которые получены к двум разным штаммам вируса гриппа В,

имели одинаковые аминокислотные замены (АкЗ), локализованные преимущественно в сайтах BD, BB1 или в непосредственной близости от последнего. Так, ЭМ 5В7 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 имели одну и ту же АкЗ в положении 122 (Н122N), а ЭМ В/4Н1/4 и В/4Н1/6 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 9F1/2 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 – АкЗ в положении 203. При этом лизин, присутствующий в данном положении у вирусов ДТ, у полученных ЭМ В/4Н1/4, В/4Н1/6 и 9F1/2 был заменен на разные аминокислотные остатки - К203Т, К203I и К203N соответственно. Другой ЭМ - 9F1/1 имел две АкЗ: А202Е и А317V.

Впервые идентифицированный нами эпитоп в положении 317 не был ранее указан ни в одной из известных на данный момент антигенно значимых областей HA1 вируса гриппа В, хотя в ряде работ [11, 12] показаны АкЗ в положениях 313 и 314 в HA1 природных дрейф-вариантов вируса, которые находятся в непосредственной близости от идентифицированной нами АкЗ (А317V) в составе ЭМ 9F1/1.

Исходные штаммы В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 различались по наличию потенциального сайта N-гликозилирования в положении 197 (NEN и NET соответственно). Все ЭМ вируса В/Малайзия/2506/04, а именно 11F8, 9F1/1 и 9F1/2, утратили потенциальный сайт N-гликозилирования в положении 197 (вне зависимости от других приобретенных аминокислотных замен), одним из наиболее вероятных объяснений чего может служить появление host-зависимых мутаций в результате реклонирования в КЭ, как это было показано ранее и в других исследованиях [13, 14]. Предполагается, что наличие потенциального сайта N-гликозилирования в положении 197 может препятствовать репликации вируса в КЭ [15].

Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных сайтов в молекуле HA1 построена нами на основе идентификации изменчивых эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы HA1 вируса гриппа В/Гонконг/8/73 (PDB code: 3BT6) с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2. Идентифицированы замены АК в HA1 в позиции 122 в ЭМ 5В7 (Н→N) вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04, а также в позиции 202 в ЭМ 9F1/1

Таблица 2

Взаимодействие полученных ЭМ (5В7, В/4Н1/4, В/4Н1/6, 9F1/1, 9F1/2 и 11F8) с гомологичными и гетерологичными МКА в РТГА

Штамм	Титр ⁻¹ МКА в РТГА					Замена АК	Локализация (сайт)
	5В7	В/4Н1	9F1	11F8	9С1		
В/Шандонг/07/97	640	20 480	20 480	320	20 480	-	-
В/Малайзия/2506/04	640	20 480	20 480	640	20 480	-	-
ЭМ 5В7	< 20	20 480	20 480	< 20	20 480	Н122N	BD
ЭМ В/4Н1/4	640	< 20	< 20	160	< 20	К203Т	Вблизи BB1
ЭМ В/4Н1/6	640	< 20	160	160	< 20	К203I	Вблизи BB1
ЭМ 9F1/1	320	20 480	< 20	160	20 480	А202Е	Вблизи BB1
						Н197S	BB1
						А317V	? (выявлена впервые)
ЭМ 9F1/2	320	< 20	< 20	160	< 20	К203N	Вблизи BB1
						Н197S	BB1
ЭМ 11F8	20	20480	20480	< 20	20480	Н122N	BD
						Н197S	BB1

Примечание. Жирным шрифтом выделены гомологичные пары ЭМ + МКА.

(А→Е) этого вируса и позиции 203 у ЭМ В/4Н1/4 (К→Т) и у ЭМ В/4Н1/6 (К→I) вируса гриппа В/Шандонг/07/09. Кроме того, локализованы замена (К203N) у ЭМ 9F1/2 и замена А317V в ЭМ 9F1/1, а также N197S в ЭМ 9F1/1, ЭМ 9F1/2 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/ Малайзия /2506/04 (см. рисунок).

Влияние аминокислотных в составе гемагглютинаина ЭМ вирусов гриппа В на характер взаимодействия с МКА. Для определения влияния аминокислотных замен в молекуле HA1 на характер реагирования со специфическими АТ в перекрестной РТГА изучено взаимодействие полученных ЭМ с различными типами МКА к вирусам гриппа В Викторианской ЭЛ. Установлено, что все полученные ЭМ полностью утратили способность к взаимодействию с гомологичными МКА, использованными для селекции. Два разных ЭМ вируса гриппа В/ Шандонг/07/97 (В/4Н1/4 и В/4Н1/6) и мутанты вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 (9F1/1 и 9F1/2) различались по спектру реагирования с панелью МКА. Так, ЭМ В/4Н1/4, имевший замену К203Т, утратил способность к взаимодействию не только с гомологичными МКА, но и с МКА 9F1 и 9С1, тогда как ЭМ В/4Н1/6 (замена К203I) сохранил остаточную (1/128 титра) способность к связыванию МКА 9F1 при полной утрате способности к реагированию с МКА 9С1. ЭМ 9F1/1 и 9F1/2 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 в результате замен АК в позициях 202, 197, 317 и 203, 197 соответственно перестали реагировать с гомологичными МКА, но ЭМ 9F1/2 - одновременно и с МКА В/4Н1. Это свидетельствует о том, что для ЭМ значимым является не только определенное положение аминокислотного остатка, но и конкретная аминокислотная замена. МКА 9С1 утратили способность к связыванию с двумя ЭМ (В/4Н1/4 и В/4Н1/6), имевшими замену в положении 203. Такого рода отличия получены и при исследовании двух ЭМ к МКА 9F1. В частности, если ЭМ 9F1/1 с тремя заменами АК (А202Е, А317V, N197S) стал резистентным только к гомологичным МКА, ЭМ 9F1/2 с двумя заменами (К203N, N197S) приобрел удивительную способность ускользать сразу от трех МКА (В/4Н1, 9F1 и 9С1). Интересно, что ЭМ 5В7 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 практически полностью перестал реагировать с МКА 11F8, а ЭМ 11F8 - с МКА 5В7, что могло бы быть объяснено АК заменой в одном и том же положении (Н122N) в составе этих ЭМ (табл. 2).

На основании данных секвенирования последовательностей HA вирусов гриппа В ранее установлено, что АК N163, E198, A202 и K203 являются высококонсервативными у вирусов Викторианской ветви и могут влиять на связывание с углеводными цепями. Кроме того, АК в положениях 202 и 203 входят в состав рецепторсвязывающего кармана. Значимость мутации в положении 203 предстоит изучить далее в связи с опубликованными данными [16] о том, что замена лизина в положении 203 может существенно влиять на антигенные и рецепторные свойства вирусной частицы, в частности снижать способность связываться с SA α2,3 Gal-рецепторами.

Заключение

Таким образом, результаты выполненных исследований дали возможность четко локализовать иммунодоминантные сайты в составе молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ, которые позволяют вирусу ускользать от специфического связывания с АТ. Три из полученных ЭМ имели одиночные, два – двойные и один – тройные замены аминокислот в молекуле HA1 (Н122N, А202Е, К203Т, К203I, К203N или А317V).

Кроме того, у трех ЭМ выявили замену N197S. При этом весьма важной является замена К203Т, сообщающая вирусу резистентность к разнонаправленным МКА. Подобные штаммы в меньшей мере подвержены селективному иммунопрессингу, потому что эволюционной точки зрения имеют большие перспективы длительной циркуляции в человеческой популяции.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Kanegae Y., Sugita S., Endo A., Ishida M., Senya S., Osako K., et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* 1990; 64: 2860–5.
2. McCullers J.A., Saito, T. & Iverson, A.R. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J. Virol.* 2004; 78: 12817–28.
3. Shih S., Chen G., Yang C., Yang W., Liu D., Lin J. et al. Laboratory based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1651–61.
4. Sominina A.A., Lonskaya N.I., Eroplin M.Yu., Litvinova O.M., Konovalova N.I., Lobova T.G. et al. To the question of the strains composition of influenza vaccine for the forthcoming 2005–2006 epidemic season. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika.* 2005; 4: 3–7. (in Russian) [Соминина А.А., Лонская Н.И., Еропкин М.Ю., Литвинова О.М., Коновалова Н.И., Лобова Т.Г. и др. К вопросу о штаммовой композиции гриппозных вакцин на предстоящий эпидемический сезон 2005 – 2006 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2005; 4: 3–7].
5. Shen J., Kirk B., Ma J., Wang Q. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin. *J. Med. Virol.* 2009; 81(1): 114–24.
6. Kohler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976; 6: 511–9.
7. Kaverin N, Rudneva I., Govorkova E., Timofeeva T., Shilov A., Kochergin-Nikitsky K., et al. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 2007; 81: 12911–7.
8. Nakagawa N., Kubota R., Nakagawa T., Okuno Y. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop'. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 769–73.
9. Wang Q., Cheng F., Lu M., Tian X., Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J. Virol.* 2008; 82: 3011–20.
10. Stray S., Pittman L. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 2012; 9:91 doi:10.1186/1743-422X-9-91.
11. Lindstrom S., Hiromoto Y., Nishimura H., Saito T., Nerome R., Nerome K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* 1999; 73(5): 4413–26.
12. Lobova T.G., Prokopets A.V., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Payankova V.F., Sukhovetskaya V.F. et al. Evolutionary variability of influenza B viruses in Russian Federation in 2005-2012. *Voprosy virusologii.* 2012; 54(6) : 22–6. (in Russian) [Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Паянкова В.Ф., Суховецкая В.Ф. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. *Вопросы вирусологии.* 2012; 54(6): 22–6.]
13. Chen Z., Aspelund A., Jin H. Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs. *Vaccine.* 2008; 26: 361–71.
14. Gatherer D.J. Passage in egg culture is a major cause of apparent positive selection in influenza B hemagglutinin. *J. Med. Virol.* 2010; 82(1): 123–7.
15. Saito T., Nakaya Y., Suzuki T., Ito R., Saito H., Takao S., et al. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. *J. Med. Virol.* 2004; 74(2): 336–43.
16. Wang Y., Chang C., Chi C., Wang H., Wang J., Su I. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features. *J. Med. Virol.* 2012; 84(4): 679–85.

Поступила 31.05.13

Received 31.05.13