

Полученные показатели как по регионам, так и по возрастным группам оказались высокими. Число сывороток с антителами I типа в целом по обследованной группе достигало 98,8%. Несколько ниже эти показатели были в Чеченской Республике, Ярославской области, Республике Алтай. В остальных 5 обследованных регионах количество иммунных сывороток достигало 99–100%. Необходимо отметить достаточно высокие показатели средней геометрической титра антител – средний показатель $7,8 \log_2$.

Оценивая показатели коллективного иммунитета в отдельных возрастных группах, необходимо заметить, что количество иммунных сывороток в 4 группах приближалось к 100%, и только в группе взрослых оно было чуть ниже – 96,9%. Средняя геометрическая титра антител была около $8 \log_2$ во всех возрастных группах, кроме группы взрослых, в которой этот показатель равнялся $6,9 \log_2$.

Состояние коллективного иммунитета к полиовирусу II типа представлено в табл. 2.

Во всех обследованных регионах доля сывороток с антителами к полиовирусу II типа составляла от 93,8% (Воронежская область) до 98,4–100% в остальных обследованных регионах при среднем показателе 98,4%. Средняя геометрическая титра антител колебалась в пределах $6,6$ – $8,5 \log_2$ при среднем показателе $7,5 \log_2$.

Большая доля иммунных сывороток установлена практически во всех возрастных группах, она приближалась к 100%. Средняя геометрическая титра антител колебалась от $6,8 \log_2$ (взрослые) до $8,0 \log_2$ (дети 1–2 и 3–4 лет).

Состояние коллективного иммунитета к полиовирусу III типа представлено в табл. 3.

Подобно состоянию коллективного иммунитета к полиовирусам I и II типов, показатели коллективного иммунитета к полиовирусу III типа были достаточно высокими во всех обследованных регионах: процент серопозитивных сывороток колебался в пределах 96,9–100 при средней величине 98,6%. Средняя геометрическая титра антител составила $7,4 \log_2$.

В отдельных возрастных группах количество сывороток с антителами составляло 98,8 – 99,8%. Только в группе взрослых оно снижалось до 96,7%. Во всех возрастных группах отмечены достаточно высокие показатели средней геометрической титра антител: $6,6$ – $7,6 \log_2$.

Обсуждение

Проведенные исследования убедительно показали, что число иммунных лиц как в обследованных регионах, так и в отдельных возрастных группах было высоким, приближающимся к 100%. Высокий показатель и средней геометрической титра антител, величина которого никогда не опускалась ниже $6 \log_2$. Следовательно, качество вакцинопрофилактики во всех изученных регионах хорошее.

Случай заноса дикого полиовируса в Россию в 2010 г. указывает на то, что вакцинопрофилактика должна оставаться на высоком уровне с полным охватом детей всех возрастов, подлежащих вакцинации.

Заключение

Оценка состояния коллективного иммунитета к полиомиелиту в 8 регионах России свидетельствовала о его высоких показателях как во всех обследованных регионах, так и в отдельных возрастных группах.

Поступила 16.09.14

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 578.832.1:578.531.08

Дешева Ю. А., Смолоногина Т. А., Руденко Л. Г.

Доклиническое изучение реассортантного вакцинного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2)

ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376, г. Санкт-Петербург

В настоящем исследовании изучены свойства реассортантного штамма вируса гриппа A/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), подготовленного в отделе вирусологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН. Вакцинный кандидат на основе донора аттенуации A/Ленинград/134/17 (H2N2), содержащий гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) апатогенного птичьего вируса гриппа A(H9N2) линии G1, проявлял свойства температурочувствительности и холодовой адаптации. При интраназальном введении мышам вакцинный штамм A(H9N2) был аттенуированным, не размножался в легких, но хорошо репродуцировался в носовых ходах, вызывая выработку поствакцинальных антител. Вакцинный штамм A(H9N2) был иммуногенен при введении мышам в виде как интраназальной живой гриппозной вакцины (ЖГВ), так и инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ). Интраназальное введение ЖГВ подтипа A(H9N2) стимулировало выработку локальных антител, что приводило к снижению репродукции в легких заражающего вируса другой антигенной разновидности G9.

Ключевые слова: вирус птичьего гриппа; гриппозная вакцина.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 40–44.

Desheva Yu.A., Smolonogina T.A., Rudenko L.G.

A preclinical trial of the reassortant influenza virus vaccine strain A/17/Quail/Hong Kong/97/84 (H9N2)

Institute of Experimental Medicine, 197376, St. Petersburg, Russia

In this work, we examined the reassortant influenza virus strain A/17/Quail/Hong Kong/97/84 (H9N2) prepared at the Virology Department, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences. The A/Leningrad/134/17 (H2N2)-based vaccine candidate contained hemagglutinin and the neuraminidase from the nonpathogenic avian influenza A virus A(H9N2) of the G1 antigenic lineage. The vaccine candidate showed the ts-properties and cold adaptation. When administered intranasally to mice, the vaccine strain A(H9N2) was attenuated. It did not multiply in the lungs but was reproduced well in the nasal cavity, causing the production of the post-vaccination antibody. The A/17/Quail/Hong Kong/97/84(H9N2) virus was immunogenic when administered to mice as a LAIV intranasally or as a IIV intramuscularly. Intranasal A(H9N2) LAIV stimulated local production of the antibodies, which resulted in reduction in lung titers of the challenge virus G9.

Key words: avian influenza virus; influenza vaccine.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 40–44. (In Russ.)

For correspondence: Yuliya Desheva, MD, PhD, DSc; e-mail: desheva@mail.ru

Received 17.03.14

Для корреспонденции: Дешева Юлия Андреевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: desheva@mail.ru

Вирусы птичьего гриппа подтипа А(Н9N2) характеризуются высокой способностью передаваться от птиц к домашним животным и человеку в связи с легким возникновением вариантов, обладающих сродством к сиаловым рецепторам млекопитающих [1]. В сероэпидемиологических исследованиях, проведенных в Китае, выявлены антитела к вирусам А(Н9N2) у 15% работников птицефабрик [2]. Вирусы А(Н9N2), выделенные от людей с симптомами респираторной инфекции в Гонконге и Китае с 1997 по 2009 г. [3], принадлежали в основном к антигенной линии G1 в отличие от других вирусов А(Н9N2), выделенных от свиней и домашней птицы и относящихся к антигенной разновидности G9. Вирусы А(Н9N2), вызвавшие случаи заболевания у людей, не являлись высокопатогенными (ВП), т. е. не обладали высокорасщепляемым гемагглютинином (НА) и не были высоковирулентными для домашней птицы [4]. Тем не менее молекулярно-генетический анализ генов, кодирующих внутренние белки вирусных изолятов А(Н9N2), показал их сходство с ВП вирусами А(Н5N1), вызвавшими вспышку среди людей в 1997 г. [5]. Филогенетический анализ показал, что после 1994 г. евразийские вирусы А(Н9N2) в результате процессов генетической реассортации с участием вирусов G1 и G9, циркулирующих среди дикой и домашней птицы, сформировали уже несколько антигенных линий. В последнее время в Китае доминирующими становятся линии h9.4.2.5, h9.4.2.6, представленные изолятами А(Н9N2), полученными в 2005–2011 гг. от кур. В то же время продолжается глобальное распространение линий h9.3.3, h9.4.1 и h9.4.2, представленных вирусами А(Н9N2) А/утка/Хоккайдо/26/99, А/перепел/Гонконг/G1/97 и А/курица/Гонконг/G9/97, при этом две последние линии могут представлять наибольшую угрозу для здоровья населения по сравнению с другими [6]. Поскольку вирусы птичьего гриппа подтипа Н9 передаются человеку, имеют генетическое сходство с ВП вирусами А(Н5N1) и широко распространены в Азии, Европе и на Ближнем Востоке, разработка вакцин, защищающих человека от гриппа подтипа А(Н9N2), была включена ВОЗ в общий план предпандемической подготовки [7]. В нашей стране в доклинических и клинических испытаниях ранее были изучены вакцинные штаммы против потенциально пандемического и пандемического гриппа подтипов Н1, Н5 и Н7, полученные на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) [8, 9]. Настоящее исследование посвящено изучению биологических свойств вакцинного штамма А(Н9N2), разработанного на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) и содержащего гены поверхностных гликопротеинов НА и нейраминидазы (NA) от вируса птичьего гриппа А/перепел/Гонконг/G1/97 (Н9N2).

Материалы и методы

Вирусы. В работе были использованы холодоадаптированный (ХА) донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) [Лен/17] из коллекции отдела вирусологии ФБГУ «НИИЭМ» СЗО РАМН; реассортантный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) [Лен17/Н9], полученный методами классической генетической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) на основе донорского штамма Лен/17 по описанным ранее методикам [10]. Реассортант унаследовал гены НА и NA от птичьего вируса и 6 генов негликозилированных белков от донора аттенуации Лен/17 (формула генома 6:2), что было подтверждено рестрикционным анализом ДНК-копий генов внутренних и неструктурных белков и секвенированием генов НА и NA. В исследовании также использовали вирусы гриппа подтипа А(Н9N2), выделенные в Гонконге от птиц и человека: А/перепел/Гонконг/G1/97 (Н9N2) [Н9N2-дт], А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/G9/97 (Н9N2), предоставленные Центром по контролю и предупреждению заболеваний, США. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 10–11-дневных РКЭ: реассортант Лен17/Н9 и родительский штамм Лен/17 при 34°C в течение 48 ч, дикие вирусы подтипа А(Н9N2) при 37°C в течение 24–26 ч.

Оценка прививочных свойств реассортантного вируса Лен17/Н9 на мышах

Патогенность изучали на самках мышей линии СВА в

возрасте 10–12 нед (питомник Рапполово, Ленинградская область). Мышей под легкой эфирной анестезией заражали интраназально 0,05 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости с 6 lg или 7 lg ЭИД₅₀ реассортантного вируса или 6 lg ЭИД₅₀ одного из родительских штаммов. В контрольной группе животным вводили 0,05 мл стерильного фосфатного буферного раствора (ФБ). Эвтаназию проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003). Репродукцию вирусов определяли в легких и носовых ходах мышей (по 3 из каждой группы) на 3-и сутки по показателям титрования суспензии органов в РКЭ начиная с разведения 1:10 для легких и 1:2 для носовых ходов.

Подготовка инактивированного антигена для парентеральной иммунизации. Вирус очищали и концентрировали по описанному методикам [11], после чего вирусную суспензию с содержанием 1 мг/мл (40 000 ГАЕ/мл) смешивали с предварительно разведенным в 40 раз 37% раствором формальдегида в соотношении 100:1 с последующей экспозицией не менее 3 сут при 4°C. Для определения полноты инаktivации вирус в неразведенном виде, а также разведенный в 10 и 100 раз инокулировали в аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов и инкубировали в течение 2 сут при 34°C, после чего содержание вируса определяли в реакции гемагглютинации.

Изучение иммуногенности. Группы мышей иммунизировали реассортантным вирусом Лен17/Н9 интраназально в дозе 7 lg ЭИД₅₀ или внутримышечно в дозе 10 мкг/0,1 мл. Часть животных иммунизировали последовательно протитипами живой (ЖГВ) и инаktivированной гриппозной вакцины (ИГВ) с интервалом 21 день. В контрольных группах животным вводили родительские вирусы Лен/17 или Н9N2-дт в дозе 6 lg ЭИД₅₀ или ФБ.

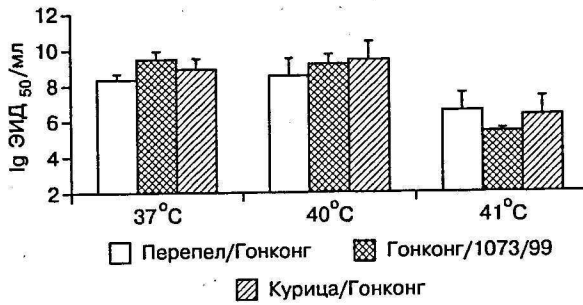
Сыворотки крови и смывы из носовых ходов мышей были получены через 4 нед после последней иммунизации. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) и реакцию микронеutralизации (РМН) с сыворотками проводили с использованием в качестве антигена реассортантного вируса Лен17/Н9. Реакцию нейтрализации выполняли, как описано ранее [12], за исключением того, что спектрофотометрию планшетов после окрашивания 0,2% спиртовым раствором кристаллического фиолетового проводили при длине волны 630 нм. Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения вирусспецифических IgG и IgA выполняли по описанной методике [12] в 96-луночных планшетах («Sarstedt, Inc.», Ньютон, Северная Каролина, США), которые предварительно сенсбилизировали 100 ГАЕ/0,1 мл цельного очищенного вируса Лен17/Н9. Результаты выражали в десятичных логарифмах величины, обратной конечному разведению. За конечное разведение принимали наименьшее разведение образца, дающее оптическую плотность при длине волны 490 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

Экспериментальное заражение. Животным, предварительно иммунизированным по схемам ЖГВ-плацебо и ИГВ-ЖГВ, а также контрольным интактным животным вводили интраназально по 0,05 мл вируса А/курица/Гонконг/G9/97 (Н9N2) в заражающей дозе 7 lg ЭИД₅₀. Репродукцию вирусов определяли в легких и носовых ходах мышей на 3-и сутки после заражения.

Статистические методы. При анализе полученных результатов определяли среднегеометрические титры, средние величины и среднеквадратическое отклонение ($M \pm СКО$). Статистическую значимость различий устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна - Уитни при критическом уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

В процессе отбора потенциальных кандидатов для подготовки вакцинных штаммов против возможных пандемий будущего была произведена оценка репродукции в куриных эмбрионах различных штаммов вируса птичьего гриппа подтипа Н9. Для определения верхней ограничительной температуры были изучены характеристики репродукции в



Определение верхней ограничительной температуры инкубации в куриных эмбрионах вирусов гриппа подтипа А(Н9N2), выделенных от птиц и человека.

По оси абсцисс – показатели температурных режимов инкубации исследуемых вирусов А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2); по оси ординат – показатели 50% эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀), выраженные в log₁₀.

РКЭ при различных температурах следующих вирусов: А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), А/Гонконг/1073/99 (Н9N2), А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2). Показана высокая степень температуростойкости всех исследованных вирусов: показатели инфекционности при 40°C практически не отличались от таковых при 37°C (см. рисунок), и только при повышении температуры до 41°C репродукция указанных штаммов снижалась.

При изучении фенотипических свойств вакцинного кандидата Лен17/Н9 были продемонстрированы высокий уровень репродукции при понижении температуры инкубации до 25°C и практически полное отсутствие инфекционности при 40°C, что свидетельствовало о приобретении реассортантным вирусом Лен17/Н9 свойств температурочувствительности (Δ-фенотип) и холодовой адаптации (са-фенотип), являющихся маркерами аттенуации (табл. 1).

При интраназальном введении мышам линии СВА в заражающей дозе 6 - 7 lg ЭИД₅₀ реассортант Лен17/Н9 репродуцировался в носовых ходах в титрах 1,1 - 3,5 lg ЭИД₅₀/мл соответственно и не размножался в легочной ткани, где температура существенно выше, чем в носовых ходах (табл.2). Выделенный от птиц в 1999 г. вирус А(Н9N2) дикого типа размножался в легких мышей без предварительной адаптации в среднем титре 4,9 lg ЭИД₅₀/мл. При этом средняя потеря массы тела подопытных животных на 3 - 5-е сутки после инфекции диким вирусом А(Н9N2) не превышала 4% (данные не показаны), что подтверждает полученные ранее сведения о низкой патогенности для мышей вирусов птичьего гриппа подтипа А(Н9N2) [13].

Однократное интраназальное введение вакцинного штамма А(Н9N2) мышам вызывало образование нейтрализующих сывороточных антител к гомологичному вирусу (табл. 3). При этом уровни поствакцинальных антигемагглютинирующих антител не отличались от таковых в контрольной группе интактных животных, однако в ИФА выявлено наличие в поствакцинальных носовых смывах мышей иммуноглобулинов – IgG и IgA к вакцинному вирусу. Интраназальное введение родительского вируса Лен17 подтипа А(Н2N2) также вызывало формирование локальных IgA, реагирующих с вирусом А(Н9N2). Достоверное увеличение уровней поствакцинальных антигемагглютинирующих антител было достигнуто только в группах, включающих ИГВ (см. табл. 3). Иммунизация вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2), принадлежащим к антигенной линии G1, создавала 25–50% за-

щиту от инфекции вирусом другой антигенной разновидности А/курица/Гонконг/Г9/97 (Н9N2) даже при отсутствии перекрестно-реагирующих антигемагглютинирующих антител (табл. 4).

Таким образом, представленный вакцинный кандидат А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) с формулой генома 6:2 характеризовался высоким уровнем репродукции в куриных эмбрионах, температурочувствительностью, адаптацией к пониженной температуре культивирования, характерной для аттенуированного донорского штамма. Реассортантный вакцинный штамм, содержащий НА и NA апатогенного птичьего вируса гриппа А(Н9N2), был аттенуированным для мышей, поскольку не размножался в легких, однако хорошо репродуцировался в носовых ходах, вызывая выработку поствакцинальных антител. Штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) был иммуногенен при введении мышам в виде как ЖГВ интраназально, так и ИГВ внутримышечно. Интраназальное введение ЖГВ подтипа А(Н9N2) стимулировало выработку локальных антител, что приводило к снижению репродукции в легких заражающего вируса другой антигенной разновидности (G9).

Вакцина, разрабатываемая против потенциально пандемических вирусов гриппа, должна обладать такими качествами, как возможность быстрой наработки вирусного материала, простота транспортировки, простота введения прививаемым контингентам и наиболее широкий спектр действия против различных антигенных разновидностей в пределах одного подтипа. ЖГВ в полной мере удовлетворяет этим требованиям, поскольку вводится интраназально, производится на основе высокопродуктивных ХА донорских штаммов, выпускается в лиофилизированном виде и стимулирует различные механизмы иммунного ответа, включая локальные IgA, цитотоксические CD8⁺-Т-лимфоциты, неспецифические факторы иммунитета (интерферон, НК-клетки) [14, 15]. В настоящем исследовании был подробно изучен созданный нами вакцинный штамм на основе вируса птичьего гриппа А/перепел/Гонконг/Г1/97 (Н9N2), представляющего собой эталонный штамм антигенной линии G1.

За рубежом ранее были подготовлены и изучены вак-

Таблица 1
Репродукция реассортанта А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) и родительских вирусов при различной температуре культивирования в куриных эмбрионах

Вирус	Характеристика	Репродуктивная активность, средние титры, lg ЭИД ₅₀ /мл ± СКО, при температуре инкубации:		
		34°C	25°C	40°C
А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2)	Вакцинный кандидат	9,8 ± 0,5	7,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3
А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2)	ХА донорский штамм	9,5 ± 0,3	7,3 ± 0,2	1,5 ± 0,0
А/перепел/Гонконг/6/97 (Н9N2)	Апатогенный вирус птичьего гриппа	8,6 ± 0,3	1,5 ± 0,0	9,2 ± 0,2

Таблица 2
Репродукция реассортантного вируса гриппа А/17/перепел/Гонконг/97/84 (Н9N2) и родительских штаммов на 3-й сутки после интраназального введения мышам

Препарат	Характеристика	Заражающая доза, lg ЭИД ₅₀	Титры вируса в гомогенатах органов, М ± СКО lg ЭИД ₅₀ /мл	
			легкие (n = 3)	носовые ходы (n = 3)
Лен17/Н9	Вакцинный кандидат	6	1,5 ± 0,0	1,1 ± 0,3
		7	1,5 ± 0,0	3,8 ± 0,2
Лен17	ХА донорский штамм	6	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,3
Н9N2-дт	Апатогенный вирус птичьего гриппа	6	4,9 ± 0,5	1,8 ± 0,5

Выработка сывороточных и локальных антител через 28 дней после иммунизации мышей реассортантным вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2) в виде ЖГВ или ИГВ*

Препарат		Число животных в группе	Поствакцинальные антитела			
1-я иммунизация	2-я иммунизация		сывороточные, СГТ		локальные, М ± СКО log ₁₀	
			РТГА	РМН	ИФА	
				IgG	IgA	
ЖГВ Лен17/Н9	ФБ	5	5,0	9,1	1,6 ± 0,9	2,6 ± 0,7**
ИГВ Лен17/Н9	ФБ	6	15,9	21,8***	1,0 ± 0,5	1,6 ± 0,7
Н9N2-дт	ФБ	5	6,6	11,9	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,4
Лен/17	ФБ	5	5,0	5,0	1,4 ± 0,4	2,4 ± 0,7#
ИГВ Лен17/Н9	ЖГВ Лен17/Н9	5	11,5	13,2	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,8
ЖГВ Лен17/Н9	ИГВ Лен17/Н9	5	20,0	17,4	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,4
Контроль (ФБ)	ФБ	5	5,0	5,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Примечание. * – значения р даны по сравнению с аналогичными показателями в группе интактных животных; ** – $p = 0,005$; *** – $p = 0,005$; # – $p = 0,035$.

Защита мышей, иммунизированных вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), от реинфекции антигенно отличающимся вирусом птичьего гриппа А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2)

Препарат	Поствакцинальные антитела к штамму А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) в РТГА, СГТ	Выделение заражающего вируса из легких		Выделение заражающего вируса из носовых ходов	
		выделено/всего	средние титры вируса ± СКО Ig ЭИД ₅₀ /мл	выделено/всего	средние титры вируса ± СКО Ig ЭИД ₅₀ /мл
ЖГВ	≤ 5,0	3/4	4,2 ± 2,0	2/4	1,1 ± 0,3
ИГВ-ЖГВ	≤ 5,0	2/4	3,1 ± 1,8	2/4	1,3 ± 0,5
Контроль (ФБ)	≤ 5,0	4/4	6,9 ± 0,6	4/4	2,0 ± 0,8

вакцинные штаммы на основе рекомендованных ВОЗ вирусов А/Гонконг/1073/99 (H9N2) и А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) [16, 17]. В доклинических и клинических испытаниях инактивированных вакцин на основе вируса А/Гонконг/1073/99 (H9N2) было обнаружено, что субъединичная вакцина значительно уступала в иммуногенности цельновирионной. У 40% лиц до 1970 года рождения наблюдалась перекрестная реакция предвакцинальных сывороток с вирусом А(H9N2), что может объясняться ранее перенесенной инфекцией, вызванной вирусами А(H2N2), период циркуляции которых завершился в конце 60-х годов XX века. Поствакцинальные титры антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител в этой возрастной группе достигали протективных значений (≥ 1:40) при однократном введении субъединичной вакцины, в то время как среди большинства людей более молодого возраста, привитых двукратно субъединичным или цельновирионным препаратом, интенсивность иммунного ответа была крайне низкой [16].

В клинических испытаниях была также изучена ЖГВ на основе американского донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60(H2N2) и штамма А/курица/Гонконг/Г9/97 (H9N2) [18]. Была показана безвредность препарата; 4-кратные сероконверсии антигемагглютинирующих антител после двукратного интраназального введения в дозе 8,2 Ig ТЦИД₅₀ наблюдались у 58% лиц, которые были серонегативными до прививки. Отмечено, что хотя участниками исследования были лица не старше 1968 года рождения, среди них около 30% до прививки были серопозитивными к штамму А(H9N2), что объясняется авторами перекрестным реагированием антител, приобретенных к современным сезонным вирусам гриппа. Авторы делают вывод о необходимости обследования прививаемых контингентов до иммунизации вакциной А(H9N2). Ряд исследований подтверждает высокий уровень перекрест-

Таблица 3

ного реагирования вирусов А(H9N2) с антителами к современному эпидемическим вирусам гриппа по сравнению с другими вирусами птичьего гриппа, такими как H5 или H7 [19].

В нашем исследовании представлены результаты первого опыта по созданию отечественного вакцинного штамма для ЖГВ подтипа А(H9N2). Получено еще одно экспериментальное подтверждение способности донора аттенуации Лен/17 при скрещивании с температуроустойчивыми вирусами птичьего гриппа передавать признаки аттенуации реассортантным штаммам при сохранении последних иммуногенности и протективной активности. В целом представленные результаты свидетельствуют о том, что вакцинный кандидат А (H9N2) может быть использован для производства как живой, так и инактивированной гриппозных вакцин, поскольку не только обладает высокой репродуктивной активностью в РКЭ, но и, как показано в эксперименте на мышах, способен индуцировать иммунный ответ при интраназальном введении в виде прототипа ЖГВ и парентеральном введении в виде прототипа ИГВ.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2–8, 11–19 см. REFERENCES)

1. Каверин Н.В., Смирнов Ю.А. Межвидовая трансмиссия вирусов гриппа А и проблема пандемий. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(3): 4–10.
9. Дешева Ю.А., Смолоногина Т.А., Сергеева М.В., Рекстин А.Р., Свэйл Д., Климов А.И. и др. Изучение биологических свойств холодаадаптированного реассортантного штамма вируса гриппа подтипа H7N3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 1: 31–6.
10. Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И., Смолоногина Т.А. Штамм вируса гриппа для производства живой и инактивированной гриппозной вакцины. Патент РФ № 2464309, 2012.

REFERENCES

1. Kaverin N.V., Smirnov Yu.A. Interspecies transmission of influenza A viruses and influenza pandemics. *Voprosy virusologii*. 2003; 48(3): 4–10. (in Russian)
2. Wang M., Fu C.X., Zheng B.J. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(24): 2583–4.
3. Peiris M., Yuen K.Y., Leung C.W., Chan K.H., Ip P.L., Lai R.W. et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 1999; 354: 916–7.
4. Saito T., Lim W., Suzuki T., Suzuki Y., Kida H., Nishimura S.I. et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine*. 2001; 20(1–2): 125–33.
5. Guan Y., Shortridge K.F., Krauss S., Chin P.S., Dyrting K.C., Ellis T. et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 2000; 74(20): 9372–80.
6. Jiang W., Liu S., Hou G., Li J., Zhuang Q., Wang S. et al. Chinese and global distribution of H9 subtype avian influenza viruses. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52671.
7. World Health Organization. Antigenic and genetic characteristics of influenza A(H5N1) and influenza A(H9N2) viruses for development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness – February 2011. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2011; 86(11): 93–100. Available at: <http://www.who.int/wer/2011/wer8611.pdf>
8. Rudenko L., Kiseleva I., Mironov A., Desheva J., Larionova N., Chirkova T. et al. Development of pandemic live attenuated influenza vaccine (LAIV) in Russia. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2011; 5(Suppl. 3): 333–7.
9. Desheva Yu.A., Smolnogina T.A., Sergeeva M.V., Rekstin A.R., Swayne D., Klimov A.I. et al. Study of biological properties of cold-adapted reassortant strain of influenza virus subtype H7N3. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2009; 1: 31–6. (in Russian)
10. Desheva Yu.A., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I., Smolnogina T.A. Influenza Virus Strain for Producing Live and Inactivated Influenza Vaccine. Патент РФ № 2464309, 2012. (in Russian)

11. Shirvan A.N., Moradi M., Aminian M., Madani R. Preparation of neuraminidase-specific antiserum from the H9N2 subtype of avian influenza virus. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007; 31(4): 219–23.
12. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W. et al. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(4): 937–43.
13. Lu X., Renshaw M., Tumpey T.M., Kelly G.D., Hu-Primmer J., Katz J. M. Immunity to influenza A H9N2 viruses induced by infection and vaccination. *J. Virol.* 2001; 75: 4896–901.
14. Johnson P. R., Feldman S., Thompson J. M., Mahoney J. D., Wright P. F. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted and inactivated vaccines. *J. Infect. Dis.* 1986; 154: 121–6.
15. Rudenko L.G., Arden N. H., Grigorieva E., Naychin A., Reksin A., Klimov A. et al. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and U.S. inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine.* 2001; 19: 308–18.
16. Stephenson I., Nicholson K.G., Glück R., Mischler R., Newman R.W., Palache A. M. et al. Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99(H9N2) vaccine in healthy adults: phase I randomized trial. *Lancet.* 2003; 362: 1959–66.
17. Chen H., Subbarao K., Swayne D., Chen Q., Lu X., Katz J. et al. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate. *Vaccine.* 2003; 21:1974–9.
18. Karron R.A., Callahan K., Luke C., Thumar B., Mc Auliffe J., Schappell E. et al. A live attenuated H9N2 influenza vaccine is well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 2009; 199(5): 711–6.
19. Todd S., de Bruin E., Nhat N.T., Koopmans M., Boni M.F. Potential for H9-positive serological signals in humans due to cross-reactivity among influenza subtypes. *J. Infect. Dis.* 2014; 210(1) 161–3.

Поступила 17.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:578.832.1].036.8

Боравлева Е.Ю.¹, Чвала И.А.², Ломакина Н.Ф.¹, Репин П.И.², Мудрак Н.С.³, Руденко Л.Г.³, Гамбарян А.С.¹, Дрыгин В.В.²

Испытание апатогенного вируса гриппа H5N3 в качестве живой ветеринарной вакцины

¹ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва; ²ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир; ³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург

Сравнивали 4 экспериментальных штамма, сконструированных в лаборатории молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», с апатогенным H5N3-вирусом A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) в качестве живой ветеринарной вакцины. Экспериментальные штаммы содержали H5-гемагглютинин от вакцинного штамма VN/H5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) или аттенуированного вируса, полученного путем селекции из высоковирулентного A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Внутренние гены и нейраминидаза экспериментальных штаммов были либо от холодоадаптированного донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), либо от непатогенного H6N2-вируса A/gull/Moscow/3100/2006. В опытах на мышах было показано, что все испытанные штаммы непатогенны для мышей, после однократной вакцинации вызывают высокий прирост антител и хорошо защищают от последующего заражения высоковирулентным вирусом H5N1. Индекс патогенности на курах всех экспериментальных штаммов равен нулю при значении 2,89 для вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Сравнивали разные схемы вакцинации цыплят. Штамм dk/4182 при аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят был апатогенен, обеспечивал высокий и равномерный прирост антител и полную защиту от последующего заражения вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005.

Ключевые слова: вирус гриппа; H5N1; ветеринарная вакцина.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 44–49.

Boravleva E.Y.¹, Chvala I.A.², Lomakina N.F.¹, Repin P.I.², Mudrak N.S.³, Rudenko L.G.³, Gambaryan A.S.¹, Drygin V.V.²

Testing of apathogenic influenza virus H5N3 as a poultry live vaccine

¹M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; ²Federal Center for Animal Health (FGBI "ARRIAH"), 600901, Vladimir, Russia; ³Institute of Experimental Medicine, 197376, St. Petersburg, Russia

Four H5N2 experimental vaccine strains and the apathogenic wild duck H5N3 influenza virus A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) were tested as a live poultry vaccine. Experimental strains had the hemagglutinin of the A/Vietnam/1203/04 strain lacking the polybasic HA cleavage site or the hemagglutinin from attenuated virus (Ku/at) that was derived from the highly pathogenic influenza virus A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). The hemagglutinin of the Ku-at has the amino acid substitutions Asp54/Asn and Lys222/Thr in HA1 and Val48/Ile and Lys131/Thr in HA2, while maintaining the polybasic HA cleavage site at an invariable level. The other genes of these experimental strains were from the H2N2 cold-adapted master strain A/Leningrad/134/17/57 (VN-Len and Ku-Len) or from the apathogenic H6N2 virus A/gull/Moscow/3100/2006 (VN-Gull and Ku-Gull). A single immunization of mice with all tested strains elicited a high level of serum antibodies and provided complete protection against the challenge with the lethal dose of A/chicken/Kurgan/3/05. The pathogenicity indexes of the Ku-at and the other strains for chicken were virtually zero, whereas the index of the parent H5N1 virus A/chicken/Kurgan/3/2005 was 2.98. Intravenous, intranasal, and aerosol routes of vaccination were compared. It was shown that the strain dk/4182 was totally apathogenic for one-day-old chicken and provided complete protection against the highly pathogenic H5N1 virus.

Key words: influenza virus A; H5N1; poultry vaccine.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 44–49. (In Russ.)

For correspondence: Aleksandra Gambarya, MD, PhD, ScD; e-mail: al.gambaryan@gmail.com

Received 30.11.13

Для корреспонденции: Гамбарян Александра Сергеевна, д-р биол. наук, зав. лаб. молекулярной биологии вирусов гриппа; e-mail: al.gambaryan@gmail.com