

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., Rekstin 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.<sup>1</sup>, Чвала И.А.<sup>2</sup>, Ломакина Н.Ф.<sup>1</sup>, Репин П.И.<sup>2</sup>, Мудрак Н.С.<sup>3</sup>, Руденко Л.Г.<sup>3</sup>, Гамбарян А.С.<sup>1</sup>, Дрыгин В.В.<sup>2</sup>**

## **Испытание апатогенного вируса гриппа H5N3 в качестве живой ветеринарной вакцины**

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир; <sup>3</sup>ФГБНУ «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.<sup>1</sup>, Chvala I.A.<sup>2</sup>, Lomakina N.F.<sup>1</sup>, Repin P.I.<sup>2</sup>, Mudrak N.S.<sup>3</sup>, Rudenko L.G.<sup>3</sup>, Gambaryan A.S.<sup>1</sup>, Drygin V.V.<sup>2</sup>**

### **Testing of apathogenic influenza virus H5N3 as a poultry live vaccine**

<sup>1</sup>M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, 142782, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Federal Center for Animal Health (FGBI "ARRIAH"), 600901, Vladimir, Russia; <sup>3</sup>Institute 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

## Введение

Широкое распространение высоковирулентных вирусов гриппа кур H5N1 в странах Юго-Восточной Азии и Африки не только наносит колоссальный ущерб птицеводству этих стран, но и является источником постоянной опасности как для местного населения, так и для всего человечества. Если вирус приобретет способность передаваться от человека к человеку, возможна пандемия, сравнимая по последствиям с пандемией «испанки» 1918 г.

Созданы вакцины, которые должны обеспечить защиту людей в случае пандемии гриппа H5N1. Однако еще более благоприятным сценарием было бы прекращение циркуляции этих опасных вирусов за счет широкой вакцинации домашней птицы. Методами обратной генетики создано множество штаммов-продуцентов H5N1 для производства инактивированных вакцин [1]. Такие вакцины демонстрируют высокую эффективность в эксперименте, но по каким-то причинам не обеспечивают надежной защиты птиц при практическом применении в ветеринарии [2]. Кроме того, они слишком дороги для поголовной превентивной вакцинации домашней птицы.

Живые гриппозные вакцины требуют значительно меньших количеств антигена, чем инактивированные, поэтому они дешевле и при острой необходимости могут быть быстро наработаны в достаточных количествах [3]. Живые аттенуированные вакцины против болезней Марека, Ньюкасла, Гамборо, микоплазма, инфекционного ларинготрахеита и энцефаломиелита птиц успешно применяются в птицеводстве [4–6].

В ряде лидирующих лабораторий мира не прекращаются попытки создания живых ветеринарных вакцин против H5N1. Очень распространены живые химерные вакцины [7–9].

Так, М. Park и соавт. сконструировали химерные вакцины со встроенным доменом гемагглютинина H7 на базе вируса NDV и встроенным эктодоменом NDV на базе вируса H5N1 [8]. L. Cornelissen и соавт. сконструировали штамм NDV, экспрессирующий растворимый тример гемагглютинина H5 [7]. Вышеперечисленные вакцины были эффективны против как патогенных вирусов NDV, так и вирусов птичьего гриппа.

S. Pavlova и соавт. получили рекомбинант аттенуированного вируса ларинготрахеита кур, устойчиво экспрессирующий ген гемагглютинина H5. Данный вакцинный штамм защищал кур от высоковирулентных H5N1 вирусов различных эволюционных ветвей [9].

H. Cui и соавт. получили рекомбинант авирулентного вируса болезни Марека (MDV), экспрессирующий гемагглютинин высоковирулентного H5N1 вируса. Полученный штамм показал высокую эффективность против как летальных MDV, так и высоковирулентных H5N1 вирусов [10].

Традиционным подходом к созданию аттенуированных противогриппозных вакцин является получение реассортантов антигенно-актуального вируса с другим вирусом гриппа, так называемым донором аттенуации, которым может быть либо холодоадаптированный вирус, либо апатогенный вирус диких птиц. Однако в работах [11, 12] показано, что реассортанты с холодоадаптированными внутренними генами недостаточно иммуногенны для кур.

В последние годы становится популярной идея конструирования живых вакцин для домашней птицы на основе птичьих вирусов. Так, H. Shi и соавт. методом обратной генетики создали штамм H5N1, в гемагглютинине которого удален сайт нарезания, а все внутренние гены происходят от апатогенного H9N2 вируса A/chicken/F/98 [13].

Аналогичный реассортант с внутренними генами от апатогенного H6N2 вируса чайки получен Е.Ю. Боравлевой и соавт. [14].

W. Zhang и соавт. разработали новый температурочувствительный донор аттенуации на базе апатогенного H9N2-вируса утки. Реассортанты H5N1 с формулой 6x2 с внутренними генами от этого донора хорошо защищали кур от летальной H5N1 инфекции [15].

Появились новые подходы, базирующиеся на понимании молекулярных механизмов патогенности вирусов гриппа и методе обратной генетики [16, 17].

После того как было показано, что неструктурный белок вируса гриппа NS1 подавляет клеточный ответ на интерферон 1 [18], началась разработка так называемых дельта-NS1-вакцин (delNS1), лишенных белка NS1 частично или полностью [19–22].

Несмотря на множество наработок, использование живых анти-H5N1-вакцин в ветеринарии не практикуется по двум причинам. Во-первых, одним из затруднений является невозможность исследовать эпидемиологическую ситуацию серологически, поскольку невозможно отличить антитела, вызванные внешней инфекцией, от антител к вакцине.

Для преодоления этого затруднения используют стратегию «дифференцирования вакцинированных и инфицированных животных» (DIVA), а именно введение в вакцину специальных антигенных маркеров, отличающих ее от дикого вируса. Одним из приемов стратегии DIVA является введение в вакцинный штамм нейраминидазы, отличной от нейраминидазы циркулирующего вируса [23].

Во-вторых, имеются опасения утечки вируса в окружающую среду с восстановлением высокой патогенности за счет мутаций или реассортаций с другими вирусами [24]. Действительно, трудно исключить возможность того, что вирус, лишенный гена NS1, не приобретет этот ген при совместном заражении клетки вакцинным и диким вирусом. В то же время делеция гена NS1 настолько хорошо аттенуирует вирус, что остальные гены могут, не проявляя этого, нести в себе множественные факторы патогенности. В таком случае реассортант, восстановивший ген NS1, может оказаться весьма опасным вирусом.

Живая вакцина, не вызывающая такого опасения, должна быть аттенуирована не по одному принципу или одному гену, а желательно по всем генам, тогда она не сможет служить причиной возникновения опасных реассортантов. Теоретически можно допустить, что апатогенные H5 вирусы диких уток могут служить живой анти-H5-вакциной. В ходе долгой совместной эволюции со своими хозяевами они приспособились хорошо размножаться, не причиняя вреда инфицированной птице [25]. Однако в литературе мало данных, касающихся иммуногенности утиных вирусов для кур, более того, по данным T. Ito и соавт., вирус H5N2 диких уток вообще не способен инфицировать кур [26].

Целью настоящей работы было сравнение апатогенного H5N3 вируса дикой утки и ряда штаммов, аттенуированных по разным принципам, в качестве живой ветеринарной вакцины против H5N1. Ранее мы описали получение 4 реассортантных штаммов с формулой H5N2 [12, 14]. Источниками H5-гемагглютинина для рекомбинантов служили вакцинный штамм A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG (VN-PR8) либо аттенуированный вирус H5N1, полученный путем селекции из высоковирулентного A/chicken/Kurgan/3/2005 [27]. Внутренние гены и нейраминидаза экспериментальных штаммов были либо от холодоадаптированного донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), либо от непатогенного вируса A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2) [28]. В данной работе приводятся результаты сравнительных испытаний на мышах и курах вышеописанных штаммов и апатогенного вируса дикой утки A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3).

## Материалы и методы

**Вирусы.** H6N2-вирус A/gull/Moscow/3100/2006 (gull/3100) и H5N3-вирус A/duck/Moscow/4182/2010 (dk/4182) выделены из фекалий соответственно чайки и утки с московского пруда и хранятся в коллекции Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова [28]. Вирус VNH5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) любезно предоставлен д-ром Р. Донисом (CDC, США). Холодоадаптированный вирус A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) был получен в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург).

Работа с высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 проводилась в условиях третьего уровня биологической безопасности. Вирусы выращивали в 10-дневных куриных эмбрионах. Инфекционность вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) определяли титрованием на эмбрионах и выражали в ЭИД<sub>50</sub>.

Выживаемость мышей после вакцинации и контрольного заражения и прирост антител после вакцинации

Препараты:	Доза, мкг НА/мышь	Выживаемость*	Антитела**		Протективность***
			IgG1	IgG2a	
Инактивированные вакцины (VN-PR8):					
цельновирioнная	0,5	97 ± 3	2	3,2	76 ± 12
цельновирioнная	2	96 ± 4	2,5	3,6	95 ± 3
сплит	0,5	96 ± 4	< 2	< 2	17 ± 18
сплит	2	97 ± 3	< 2	2,2	72 ± 8
Живые (штаммы) ЭИД <sub>50</sub> /мышь					
Ku/05	10 <sup>2</sup>	0	-	-	-
Ku/at	10 <sup>6</sup>	85 ± 12	3,1	4,2	98 ± 2
Ku-Len	10 <sup>7</sup>	95 ± 5	3	3,3	92 ± 6
Ku-Gull	10 <sup>6</sup>	90 ± 7	3,2	4,1	95 ± 5
VN-PR8	10 <sup>6</sup>	20 ± 10	3,5	3,9	96 ± 3
VN-Len	10 <sup>7</sup>	96 ± 3	2,9	3,2	94 ± 4
VN-Gull	10 <sup>6</sup>	91 ± 5	3,4	3,9	97 ± 2
dk/4182	10 <sup>6</sup>	96 ± 4	3,1	3,8	95 ± 4
Контроль без иммунизации	-	97 ± 3	-	-	0

Примечание. Приводятся данные, усредненные по трем опытам. Каждая группа состояла из 20 мышей; \* - % выживших после заражения испытуемым штаммом; \*\* - среднегеометрический титр, Ig; \*\*\* - % выживших на 14-й день после КЗ высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) в дозе 100 LD<sub>50</sub>.

апатогенным вирусом A/gull/Moscow/3100/2006 получены реассортанты Ku-Gull и VN-Gull. Во всех 4 реассортантах ген гемагглютиниона соответствовал гемагглютиниону H5, а все остальные гены соответствовали генам доноров аттенуации - A/Leningrad/134/17/57 для Ku-Len и VN-Len и A/gull/Moscow/3100/2006 для Ku-Gull и VN-Gull, т. е. формула всех штаммов была H5N2 [14]. В качестве сравнения с искусственными штаммами в испытании был включен вирус дикой утки A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3).

#### Безопасность, иммуногенность и протективная активность штаммов на мышах

Как видно из табл. 1, вирулентность для мышей аттенуированного вируса Ku/at по сравнению с исходным вирусом Ku/05 снижена на много порядков; она ниже, чем у американского вакцинного штамма VN-PR8. Патогенность реассортантов Ku-Gull и VN-Gull еще ниже, а холодоадаптированных реассортантов Ku-Len и VN-Len, как и вируса dk/4182, - практически нулевая.

Все экспериментальные штаммы вызывали у мышей высокий и сбалансированный по содержанию IgG1/IgG2a прирост антител к H5 гемагглютиниону вируса гриппа.

Протективный эффект любого из экспериментальных штаммов сопоставим с эффектом высокой дозы инактивированной цельновирioнной вакцины и существенно выше, чем у сплит-вакцины. Однократное инфицирование любым из них приводит почти к 100% защите от последующего КЗ 100 ЛД<sub>50</sub> вируса A/chicken/Kurgan/3/2005.

#### Индекс патогенности экспериментальных штаммов при внутривенном заражении кур

Для определения индексов патогенности были сформированы 8 групп цыплят в возрасте 42 сут по 10 голов в каждой. Группы цыплят содержали в индивидуальных изолирующих боксах.

Индекс патогенности исходного вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 составил 2,89, в то время как у всех цыплят, внутривенно зараженных штаммами VN-Len, VN-Gull, Ku/at, Ku-Len, Ku-Gull, gull/3100 и dk/4182, в течение 10 сут наблюдений не отмечали каких-либо клинических признаков заболевания, и по результатам эксперимента все штаммы были признаны низковирулентными (IVPI=0).

Аттенуированный вариант A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (Ku/at) был получен из высоковирулентного вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) культивированием в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов гриппа диких уток, как описано в [27].

Получение холодоадаптированных реассортантов VN-Len и Ku-Len, а также реассортантов VN-Gull и Ku-Gull описано в [14]. Генный состав реассортантов установлен секвенированием определенных фрагментов генома либо в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дифференцирующими праймерами [14]. Номера нуклеотидных последовательностей, зарегистрированных в GenBank: EU152234-EU152241, DQ323672-DQ323679, HQ724520-HQ724527, CY120776, KF885672-KF885679.

**Определение индекса патогенности вирусов на курах.** Внутривенно каждому из 10 6-недельных неиммунных цыплят вводили по 0,1 мл исследуемой стерильной вирусосодержащей суспензии в разведении 1:10 на стерильном фосфатно-солевом буфере (ФБР). Отсутствие специфических антител в крови цыплят подтверждали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

За птицами устанавливали ежедневное наблюдение в течение 10 сут и рассчитывали индекс патогенности (IVPI) как описано в [11].

Все экспериментальные исследования на мышах и курах проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных».

**Аэрозольная вакцинация и контрольное заражение цыплят.** Цыплят помещали в 20-литровый контейнер, к которому была подведена трубка от ультразвукового распылителя «Муссон» (изготовитель - Алтайский приборостроительный завод, г Барнаул). Отводящая трубка была направлена на HEPA-фильтр. Создавали аэрозоль из свежей ВАЖ. Цыплят выдерживали в аэрозольной атмосфере 30 мин. После обработки цыплят 10 мин облучали ультрафиолетом и рассаживали по клеткам, после чего ежедневно взвешивали, собирали фекалии и контролировали падеж. Через 14 дней брали пробы крови из подключичной вены на определение антител, а через 30 дней проводили контрольное заражение (КЗ) вирусом гриппа A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) также аэрозольным способом.

**Определение вируса в фекалиях кур.** С 3-го по 6-й день после инфицирования или после КЗ цыплят по одному пересаживали из клетки, где содержалась вся группа, в коробки с чистой фильтровальной бумагой на дне. Через полчаса собирали свежие фекалии с фильтровальной бумаги, суспендировали в двойном объеме ФБР с добавлением антибиотиков (0,4 мг/мл гентамицина, 0,1 мг/мл канамицина, 0,01 мг/мл нистатина и 2% раствора MусoKill АВ («РАА Laboratories GmbH»)), центрифугировали при 4 тыс. об/мин 10 мин и заражали супернатантом 10-дневные куриные эмбрионы. Через 48 ч инкубации собирали аллантоисную жидкость и определяли наличие вируса гриппа по реакции гемагглютинации.

**Иммунизация и контрольное заражение мышей, а также определение антител к вирусам гриппа в сыворотках мышей и цыплят** описаны в [14].

## Результаты

Для аттенуации высоковирулентного H5N1-вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 мы проводили селекцию в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток, а именно выдерживали вирус в кислой среде, обрабатывали инфекционный материал протеазами, а на последнем этапе отбирали живых эмбрионов после 3-дневного культивирования. В ходе селекции в гемагглютине Ku/at появились 4 аминокислотные замены, 3 из которых являются реверсиями к последовательности, характерной для непатогенных вирусов гриппа птиц [27].

Путем реассортации Ku/at с холодоадаптированным донором аттенуации A/Leningrad/134/17/57(H2N2) (Len) был получен штамм Ku-Len. Аналогичным образом из вакцинного штамма VNH5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR8) получен реассортант VN-Len.

Затем путем реассортации штаммов Ku-Len и VN-Len с



Таблица 2

Выживание цыплят разного возраста при разных способах заражения

Штамм	Способ заражения (возраст)		
	Внутривенный (42 сут)	Интраназальный (5 сут)	Аэрозольный (1 сут)
Ku/05	0/10*	0/5	0/5
Ku/at	10/10	8/11	-
Ku-Len	10/10	20/20	19/19
Ku-Gull	10/10	14/17	1/13
VN-Len	10/10	19/19	12/12
VN-Gull	10/10	9/10	6/10
dk/4182	10/10	8/8	26/26
gull/3100	10/10	8/8	8/8

\*Число выживших/число зараженных.

**Сравнение патогенности экспериментальных штаммов при разных схемах заражения кур**

Выживаемость инфицированных цыплят зависит от их возраста и пути введения вируса. 6-недельные цыплята выжили даже после внутривенного введения экспериментальных вакцинных штаммов (табл. 2). 5-дневные и 1-дневные цыплята частично гибли при инфицировании штаммами Ku/at, Ku-Gull и VN-Gull. Штаммы Ku-Len, VN-Len и природные изоляты dk/4182 и gull/3100 не вызвали ни одного случая падежа.

**Иммуногенность экспериментальных штаммов для цыплят**

Для оценки иммуногенности разных штаммов через 2 нед после инфицирования у каждого цыпленка брали по 200 мкл крови из подключичной вены и определяли титр специфических антител в сыворотках методом иммуоферментного анализа (ИФА). Антигенами служили соответствующие очищенные вирусы (VN-PR8 для определения антител к HA/H5 и gull/3100 для HA/H6). На рис.1 представлены титры антител в сыворотках крови индивидуальных цыплят после инфицирования реассортантными штаммами и вирусами гриппа диких птиц: A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) и A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2).

У цыплят, вакцинированных вирусами Ku-Len и VN-Len, среднегеометрические титры лежат между значениями 100 и 200, причем разброс титров от сыворотки к сыворотке достигает 20. Примерно у половины цыплят титры анти-H5-антител ниже 100, что меньше защитной величины. Вирусы Ku-Gull и VN-Gull вызывают примерно в 10 раз более высокий и более равномерный прирост антител, надежно превышающий защитный уровень у всех инфицированных цыплят. Среднегеометрические титры в группах вакцинированных dk/4182 либо gull/3100 ниже, чем в группах Ku-Gull и VN-Gull, но даже в самых «слабых» сыворотках титр превышает защитный уровень (около 200). Соотношение иммуногенности реассортантов Ku-Len и VN-Len, с одной стороны, и Ku-Gull и VN-Gull - с другой, коррелирует с их патогенностью. Однако природные изоляты dk/4182 и gull/3100 обеспечивают высокий и равномерный прирост антител, не вызывая у цыплят клинических признаков заболевания.

**Патогенность и протективная активность экспериментальных штаммов при аэрозольном заражении цыплят. Выделение вируса с фекалиями**

Сравнение внутривенной, интраназальной и аэрозольной вакцинации (табл. 2) дало основание заключить, что наиболее жестким способом инфицирования является аэрозольная вакцина-

ция 1-дневных цыплят. Кроме того, чем моложе цыплята, тем они чувствительнее к КЗ, поэтому такая схема опыта лучше всего способна выявить слабые стороны экспериментальных вакцин. В табл. 3 и на рис. 2 приводятся результаты типичного опыта по аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят с последующим заражением 100 LD<sub>50</sub> H5N1-вируса A/chicken/Kurgan/3/2005. Штаммы Ku-Gull и VN-Gull вызывают существенный падеж цыплят и выделяют вакцинный вирус с фекалиями, т. е. не пригодны для использования в качестве живой вакцины. Штаммы Ku-Len и VN-Len не вызывают признаков заболевания, нет падежа и кривая массы тела совпадает с кривой массы тела интактных цыплят; также нет выделения вируса. Однако эти штаммы недостаточно иммуногенны, и защита от последующего КЗ невелика. Наилучшие результаты получены с вирусом A/duck/Moscow/4182/2010, который не вызывал падежа и видимых признаков заболевания цыплят, но тем не менее обеспечивал высокий и равномерный прирост антител и 100% защиту от высоковирулентного вируса H5N1. После вакцинации вирус dk/4182 выделяется с фекалиями, однако возможная его утечка в окружающую среду не должна вызывать опасений, этот вирус и так циркулирует с утками как в дикой природе, так и в городских прудах. Важно то, что куры, вакцинированные вирусом dk/4182, не выделяют вирус A/chicken/Kurgan/3/2005 после КЗ. Иными словами, подобная вакцинация способна не только сохранять поголовье домашних птиц, но и тормозить распространение H5N1 вирусов.

**Обсуждение**

Вирусы H5N1 привлекли внимание широкой общественности в 1997 г. после случаев смертельных заболеваний людей в Гонконге, где методом борьбы с опасным вирусом стало поголовное уничтожение всей домашней птицы, и эта мера принесла свои плоды – данная эволюционная ветвь вирусов H5N1 была полностью уничтожена. Вплоть до 2003 г. случаев заболевания людей не отмечали. Однако другие варианты вирусов H5N1 продолжали циркулировать среди домашней птицы, и начиная с 2003 г. эпизодически вызывали заболевание людей, часто со смертельным исходом. В 2005 г. вирус распространился по всей южной части Евразии и в Африке. С вирусом ведется перманентная борьба – уничтожается поголовье птиц в местах вспышек, проводится вакцинация домашней птицы, но все эти меры оказываются недостаточными. По не совсем понятным причинам даже трехкратная вакцинация кур инактивированными вакцинами не предотвращает последующее заболевание и распространение вируса [2]. Непрекращающиеся усилия добиться полного антигенного соответствия вакцин циркулирующему вирусу приводят к ускорению эволюции вируса и изменению антигенных характеристик, что вызывает потребность в очередной модернизации вакцинных штаммов [29]. Одним из способов вырваться из этого порочного круга было бы использование живых вакцин, способных привести к гораздо более широкой перекрестной защите, чем инактивированные вакцины.

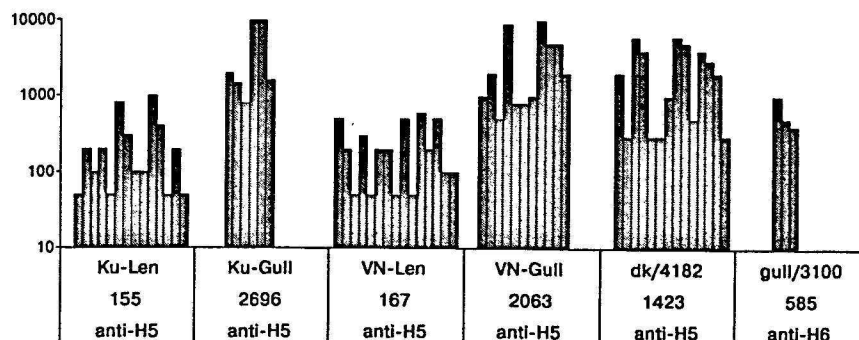


Рис. 1. Титры анти-H5- либо анти-H6-антител в сыворотках индивидуальных цыплят, инфицированных вирусами Ku-Len, Ku-Gull, VN-Len, VN-Gull, dk/4182 либо gull/3100. Под названиями штаммов приведены значения среднегеометрических титров для всей группы и специфичность антител.

Таблица 3

Патогенность, выделение вируса с фекалиями и протективность экспериментальных штаммов при аэрозольной вакцинации 1-дневных цыплят

Штамм	После вакцинации			После КЗ	
	доза ЭИД <sub>50</sub>	выживаемость, %*	вирус в фекалиях**	выживаемость, %	вирус в фекалиях
Ku-Len	10 <sup>6</sup>	100	-	25	+/-
Ku-Gull	10 <sup>5</sup>	20	+	100	-
VN-Len	10 <sup>6</sup>	100	-	20	+/-
VN-Gull	10 <sup>5</sup>	40	+	100	-
dk/4182	10 <sup>5</sup>	100	+/-	100	-
Контроль без иммунизации	-	100		0	+/-

Примечание.\* – выживаемость к стартовой величине после заражения испытуемым штаммом и после КЗ 100 LD<sub>50</sub> вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1); \*\* – обнаружение вакцинного вируса (до КЗ) или вируса Ku/05 (после КЗ) в фекалиях на 3–6-й день после инфицирования. + – всегда, – – никогда, +/- – иногда.

В данной работе мы испытали в качестве живых ветеринарных вакцин 5 штаммов с гемагглютинином трех эволюционных ветвей субтипа H5. Наши результаты подтвердили данные A. Sugitani и соавт. [11] о том, что вирусы с внутренними генами холодоадаптированного донора чрезмерно аттенуированы для кур и не обеспечивают надежной защиты. В то же время все 3 штамма с внутренними генами от вирусов диких птиц обеспечивали полную защиту от КЗ высоковирулентным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1), несмотря на то, что гемагглютинин штамма VN-Gull относится к другой кладе H5N1-вирусов, а гемагглютинин вируса A/duck/Moscow/4182/2010 – к отдаленной эволюционной ветви вирусов субтипа H5 [30]. Результаты испытаний реассортантов Ku-Gull и VN-Gull дают информацию о механизмах патогенности H5N1-вирусов. Оба этих штамма имеют 7 генов вируса gull/3100, полностью безопасного для цыплят. Гемагглютинин Ku-Gull несет 4 аттенуирующие мутации, снижающие рН конформационного перехода гемагглютина от 5,6 до 5,1. Тем не менее этот реассортант вызывает гибель 1-дневных цыплят, очевидно, за счет сохранения полносного сайта нарезания, который считается основным маркером патогенности вирусов гриппа птиц. Гемагглютинин VN-Gull лишен полносного сайта, однако этот реассортант также вызывает гибель 1-дневных цыплят, по-видимому, за счет высокого рН конформационного перехода. На зависимость инфекционности H5N1-вируса от рН конформационного перехода указывали также В. Клепп и соавт [20]. Иными словами, только молекула гемагглютинаина H5N1-вирусов обеспечивает как минимум два механизма повышения патогенности для кур.

Другие гены тоже несут многочисленные факторы патогенности (эта тема обсуждается в работе [27]). Это необходимо иметь в виду, конструируя вакцинные штаммы H5N1. В последние годы методом обратной генетики создано много экспериментальных живых вакцин путем внесения в геном вируса одного или ряда изменений, радикально устраняющих отдельные факторы патогенности. Полученные штаммы глубоко аттенуированы при сохранении хорошей иммуногенности [19–22]. Однако генетическая стабильность таких конструкций может вызывать сомнения. В случае реассортации, рекомбинации или реверсии может возникнуть вирус с нежелательными характеристиками. Не случайно в последнее время снова становится популярной старая идея В. Мигри – использовать гены авирулентных вирусов диких птиц как доноры аттенуации при создании вакцин [12–15, 31]. Вирусы гриппа диких птиц тысячами подвергались стабилизирующему естественному отбору по признаку авирулентности. Лишь в противостественных условиях птицеводческих ферм с круглогодичной скученностью птицы повышение вирулентности перестает

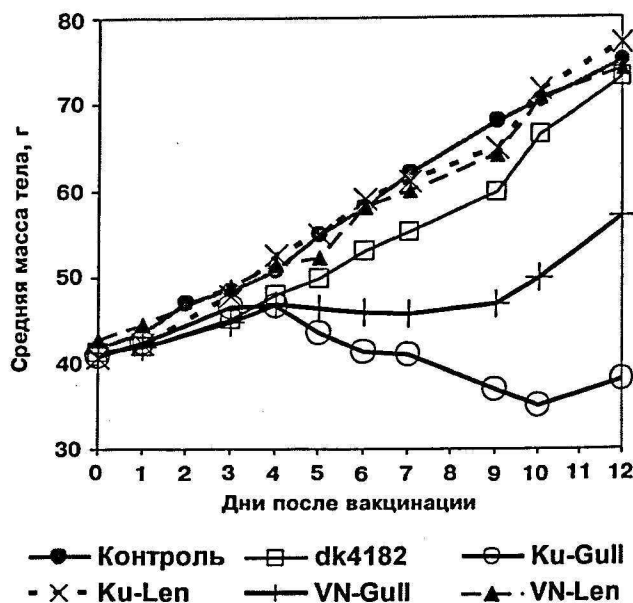


Рис. 2. Динамика массы тела цыплят после аэрозольного заражения штаммами VN-Len, VN-Gull, Ku-Len, Ku-Gull и dk/4182.

быть препятствием для распространения вируса. За годы циркуляции в домашних курах у H5N1-вирусов практически во всех генах накопилось множество мутаций, повышающих их патогенность.

Логическим завершением идеи В. Мигри является использование в качестве живой вакцины природного авирулентного вируса целиком. Наш опыт показывает, что вирус H5N3 дикой утки хорошо работает в качестве живой ветеринарной вакцины против вирусов H5N1. Такая вакцина должна быть генетически стабильной. Возможная утечка вакцинного вируса во внешнюю среду не должна представлять проблемы, так как этот вирус и так свободно в ней циркулирует. Дополнительными преимуществами такой вакцины являются простота производства, дешевизна и отсутствие необходимости покупки патентов на использование.

### Выводы

1. Получены аттенуированные реассортанты вирусов гриппа H5N1, перспективные в качестве продуцентов инактивированных и живых вакцин.
2. Выбран штамм, который можно рассматривать как кандидат на ветеринарную живую вакцину против высоковирулентных вирусов H5N1.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. С.С. Ямниковой за предоставление штамма A/chicken/Kurgan/3/2005, к.б.н. М.А. Циванюк и к.б.н. А.В. Щербакову (ФГБУ «ВНИИЗЖ») за участие в отдельных этапах работы и д-ру R.Donis (Центры по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, Джорджия, США) за предоставление вакцинного штамма VN5N1-PR8/CDC-RG. Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-00517-а, 14-04-00547.

### ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1–2, 4–13, 15–17, 19–26, 29–31 см REFERENCES)

3. Гендон Ю.З. Преимущества и недостатки инактивированной и живой вакцины против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(4): 4–12.
14. Боравлева Е.Ю., Ломакина Н.Ф., Кропоткина Е.А., Руднева И.А., Дрыгин В.В., Гамбарян А.С. и др. Упрощенный способ получения реассортанта вируса гриппа с H5 гемагглютинином и остальными генами от патогенного H6N2 вируса. Испытание полученного штамма на мышах и курах. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(6): 9–14.

18. Романовская-Романько Е.А., Ferko В., Вышемирский О.И., Романова Ю.Р., Krenn В., Muster Т. и др. Доклинические исследования интраназальной живой гриппозной H5N1-вакцины с удаленным NS1-геном. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(6): 19–22.

27. Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю., Кропоткина Е.А., Ямникова С.С., Дрыгин В.В., Гамбарян А.С. Аттенуация вируса гриппа А/курица/Курган/3/2005 (H5N1) селекцией в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 3: 35–41.

28. Ломакина Н.Ф., Гамбарян А.С., Боравлева Е.Ю., Кропоткина Е.А., Кириллов И.М., Лаврентьев М.В. и др. Характеристика апатогенного вируса гриппа А/Чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), выделенного в г. Москве. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2009; 1: 32–40.

## REFERENCES

- Jung E.J., Lee K.H., Seong B.L. Reverse genetic platform for inactivated and live-attenuated influenza vaccine. *Exp. Mol. Med.* 2010; 42(2): 116–21.
- Kim J., Kayali G., Walker D., Forrest H.L. Webby R.J., Webster R.G. et al. Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *PNAS*. 2010; 107(24): 11044–9.
- Gendon Yu.Z. Advantages and disadvantages of inactivated and live influenza vaccine. *Voprosy Virusologii*. 2004; 49(4): 4–12. (in Russian)
- Chien K.Y., Blackburn K., Liu H.C., Goshe M.B. Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of chicken Embryo Fibroblasts Infected with Cell Culture-Attenuated and Vaccine Strains of Marek's Disease Virus. *J. Proteome Res.* 2012; 11(12): 5663–77.
- Evans J.D., Leigh S.A., Purswell J.L., Jacob R., Peebles E.D., Collier S.D. et al. A comparative study of live attenuated F strain-derived *Mycoplasma gallisepticum* vaccines. *Avian Dis.* 2012; 56: 396–401.
- Vagnozzi A., Zavala G., Riblet S.M., Mundt A., Garcia M. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2012; 41(1): 21–31.
- Cornelissen L.A., de Leeuw O.S., Tacken M.G., Klos H.C., de Vries R.P., de Haan C.A. et al. Protective efficacy of Newcastle disease virus expressing soluble trimeric hemagglutinin against highly pathogenic H5N1 influenza in chickens and mice. *PLoS One*. 2012; 7(8): e44447.
- Park M.S., Steel J., Garcia-Sastre A., Swayne D., Palese P. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006; 103(21): 8203–8.
- Pavlova S.P., Veits J., Mettenleiter T.C., Fuchs W. Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype. *Vaccine*. 2009; 27(37): 5085–90.
- Cui H., Gao H., Cui X., Zhao Y., Shi X., Wang Y. et al. Avirulent Marek's Disease Virus Type 1 Strain 814 Vectors Expressing Avian Influenza (AI) Virus H5 Hemagglutinin Induced Better Protection Than Turkey Herpesvirus Vectors AI Vaccine. *PLoS One*. 2013; 8(1): e53340.
- Suguitan A.L. Jr, McAuliffe J., Mills K.L., Jin H., Duke G., Subbarao K. et al. Live, Attenuated Influenza A H5N1 Candidate Vaccines Provide Broad Cross-Protection in Mice and Ferrets. *PLoS Med.* 2006; 3(9): 1541–54.
- Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Klimov A.I., Rudenko L.G. et al. Comparative safety, immunogenicity and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models *Influenza Other Respir. Viruses*. 2012; 6(3): 188–95.
- Shi H., Liu X.F., Zhang X., Chen S., Sun L., Lu J. Generation of an attenuated H5N1 avian influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses. *Vaccine*. 2007; 25(42): 7379–84.
- Boravleva E.Yu., Lomakina N.F., Kropotkina E.A., Rudneva I.A., Drygin V.V., Gambaryan A.S. et al. The generation and characteristics of reassortant influenza A virus with H5 hemagglutinin and other genes from the apathogenic virus H6N2. *Voprosy Virusologii*. 2011; 56(6): 9–14. (in Russian)
- Zhang W., Tu J., Zhao Z., Chen H., Jin M. The new temperature-sensitive mutation PA-F35S for developing recombinant avian live attenuated H5N1 influenza vaccine. *Virology*. 2012; 23(9): 97. doi: 10.1186
- Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P. M., eds. *Fields virology*. 5th ed., vol. II. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA; 2006: 1648–89
- Steel J. New strategies for the development of H5N1 subtype influenza vaccines: progress and challenges. *BioDrugs*. 2011; doi: 10.2165
- Romanovskaya-Roman'ko E.A., Ferko B., Vysheмирskiy O.I., Romanova Yu.P., Krenn B., Muster T. et al. Preclinical studies of live intranasal H5N1 influenza vaccine with the deleted HSI gene. *Voprosy Virusologii*. 2011; 56(6): 19–22. (in Russian)
- Garcia-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006; 312: 879–82.
- Krenn B.M., Egorov A., Romanovskaya-Romanko E., Wolschek M., Nakowitsch S., Ruthsatz T. et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18577. doi: 10.1371
- Steel J., Lowen A.C., Pena L., Angel M., Solórzano A., Albrecht R. et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J. Virol.* 2009; 83(4): 1742–53.
- Zhou H., Zhu J., Tu J., Zou W., Hu Y., Yu Z. et al. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4G1 binding domain. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(9): 1338–46.
- Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez J.F. Development of a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 2003; 32: 47–55.
- Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H. et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*. 2012; 337(6091):188.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 152–79.
- Ito T., Goto H., Yamamoto E., Tanaka H., Takeuchi M., Kuwayama M. et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J. Virol.* 2001; 75: 4439–43.
- Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Yamnikova S.S., Drygin V.V., Gambaryan A.S. Attenuation of A/Chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) Influenza Virus Using Selection in an Environment Simulating the Life Cycle of Wild Duck Viruses. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2011; 26(3): 132–9.
- Lomakina N.F., Gambaryan A. C., Boravleva E.Yu., Kropotkina E.A., Kirillov I.M., Lavrient'ev M.V., Yamnikova S.S. Character of Apathogenic Influenza A Viruses Found in Moscow, Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2009; 24(1): 37–45.
- El-Zoghby E.F., Arafa A.S., Kilany W.H., Aly M.M., Abdelwhab E.M., Hafez H.M. Isolation of avian influenza H5N1 virus from vaccinated commercial layer flock in Egypt. *Virology*. 2012; 9(1): 294
- Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group DOI:10.1111/j.1750-2659.2011.00298.x Available at: www.influenzajournal.com
- Murphy B.R., Sly D.L., Tierney E.L., Hosier N.T., Massicot J.G., London W.T. et al. Reassortant virus derived from avian and human influenza A viruses is attenuated and immunogenic in monkeys. *Science*. 1982; 218: 1330–2.