

1. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К. *Этиология хронических вирусных нейроинфекций*. М.: Медицина; 1984.
2. Гривенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(5): 38–43.
3. Гривенча С.В., Львов Д.К. Бешенство. В кн.: Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные заболевания человека и животных*. М.: Медицина; 2013: 811.
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

1. Barinskiy I.F., Shubladsze A.K. *Etiology of the Chronic Neuroinfections [Etiologiya Khronicheskikh Virusnykh Neyroinfektsiy]*. Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian).
2. Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsibezov V.V. et al. Obtaining of monoclonal antibodies against the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy Virusologii*. 2013; 58(5): 38–43. (in Russian).
3. Gribencha S.V., L'vov D.K. Rabies. In: L'vov D.K., ed. *Viruses and Viral Diseases of Humans and Animals [Virusy i Virusnye Zabolevaniya Cheloveka i Zhivotnykh]*. Moscow: Meditsina; 2013: 811. (in Russian).
4. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.

Поступила 29.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:579.841.931.012.6:578.832.1.083

Садикалиева С. О.¹, Султанкулова К. Т.¹, Шораяева К. А.¹, Строчков В. М.¹, Червякова О. В.¹, Зайцев В. Л.¹, Табынов К. К.¹, Сандыбаев Н. Т.¹, Сансызбай А. Р.¹, Егоров А. Ю.²

Генетическая стабильность HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген

¹НИИ проблем биологической безопасности, 080409, пос. Гвардейский, Казахстан; ²HSC Development GmbH, Тульн, Австрия

Сконструирован рекомбинантный штамм вируса гриппа Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, на основе технологии обратной генетики для создания векторной противобруцеллезной вакцины. Полученный рекомбинантный штамм является генетически стабильным. Стабильность подтверждена сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего ген *Omp16* (GenBank: AAA59360.1) *Brucella abortus*. Сравнительный генетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность гена NS 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC_124omp16g, содержащему химерный NS1-124-Omp16 в составе ДНК-плазмиды pHW2000. В результате сравнительного генетического анализа установлена 100% идентичность нуклеотидных последовательностей HA- и NA-генов 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами HA и NA штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1). Было показано, что рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующий бруцеллезный ген *Omp16*, сохраняет генетическую стабильность на протяжении 5 пассажей на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (ПКЭ).

Ключевые слова: рекомбинантный векторный вирус; бруцеллезный ген; гемагглютинин; нейраминидаза; неструктурный белок; полимеразная цепная реакция; генетический анализ.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 18–23.

Sadikaliyeva S.O., Sultankulova K.T., Shorayeva K.A., Strochkov V.M., Chervyakova O.V., Zaitsev V.L., Tabynov K.K., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Egorov A.Yu.

Genetic stability of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucellar gene

¹Scientific-Research Institute of Biological Safety Problems, 080409, Gvardeiskiy, Kazakhstan; ²HSC Development GmbH, Tulln, Austria

The recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) of the influenza virus expressing the brucellar *Omp16* gene was constructed on the basis of the technology of reverse genetics for the purpose of developing vector anti-brucellosis vaccine. The obtained recombinant strain is a genetically stable construction. This stability is confirmed by the comparative analysis of the nucleotide sequences of the HA, NA, and NS genes of the recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the *Omp16* gene of the *Brucella abortus* (GenBank: AAA59360.1). The comparative analysis showed that the nucleotide sequence of the NS gene of the first and the fifth passage level of the Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) virus corresponded for 100% to the initial part of 12AAS2TC_124 Omp16g containing the chimera NS1-124-Omp16 in the composition of DNA (deoxyribonucleic acid) plasmids pHW2000. Total identity with HA and NA genes of the strain A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) was shown by the comparative analysis of the nucleotide sequences of HA and NA genes of the first and the fifth passage level of the recombinant strain Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). The recombinant vector virus Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) expressing the brucella *Omp16* gene maintains the genetic stability during 5 passages in 10-day developing chicken embryos.

Key words: recombinant vector virus; brucellosis gene; hemagglutinin; neuraminidase; non-structural protein; PCR (polymerase chain reaction); genetic analysis.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(4): 18–23. (In Russ.)

For correspondence: Sandugash Sadikaliyeva, Junior research fellow; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

Received 11.03.14

Для корреспонденции: Садикалиева Сандугаш Оразбековна, мл. науч. сотр.; e-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

Введение

Важнейшим и перспективным методом борьбы с бруцеллезной инфекцией является иммунопрофилактика. По данным Объединенного комитета экспертов ФАО, бруцеллез сельскохозяйственных животных распространен практически во всем мире [1, 2].

Противобруцеллезные вакцины имеют существенные недостатки, к которым относятся абортгенность, непродолжительный иммунитет и неэффективная защита против данной инфекции. С целью устранения этих недостатков разрабатываются новые вакцины против бруцеллеза, такие как ДНК-вакцины, векторные вакцины. В связи с этим сотрудниками НИИПББ с помощью методов обратной генетики сконструирован модифицированный по NS-гену рекомбинантный векторный вирус гриппа A Flu-NS1-124-Omp16 антигенного подтипа H5N1, несущий бруцеллезный ген.

Концепция гриппозного вектора основана на получении методом обратной генетики рекомбинантных штаммов вируса гриппа с модифицированными по длине геном NS. Белок NS1 - один из факторов патогенности вируса, ответственный за подавление врожденного иммунитета хозяина и позволяющий вирусу гриппа успешно реплицироваться на фоне подавленной системы интерферона (ИФН). Удаление белка NS1 ведет к abortивной репликации вируса из-за активации широкого круга противовирусных факторов и формирования противовирусного статуса в клетках [3-6].

У рекомбинантного штамма вируса гриппа A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), несущего бруцеллезный ген в качестве донора гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA), использован вакцинный штамм A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1), который является реассортантом высокопатогенного вируса гриппа A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Была внесена мутация в сайт протеолитического расщепления HA штамма A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) (GenBank: FJ390028.1) путем удаления аминокислотного мотива RRRK [7, 8].

Установлено, что полученный рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) является эффективным вектором для доставки бруцеллезного гена *Omp16* в организм иммунизируемых животных. Рекомбинантный гриппозный вектор Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) рекомендуется использовать в качестве кандидата для создания вакцины, обеспечивающий формирование противобруцеллезного иммунитета [9].

Целью данной работы был анализ генов NA, HA и NS рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 антигенного подтипа H5N1, несущего бруцеллезный ген *Omp16*.

Материалы и методы

Конструирование рекомбинантного векторного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). Синтез генетической конструкции, содержащей генетические сегменты PB2, PB1, PA, NP, M и NS вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (ID CY033578.1) и HA, NA вакцинного штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) вируса гриппа, проведен в двунаправленной экспрессионной плазмиде рНВ [10, 11].

Для создания векторной вакцины на основе вируса гриппа, стабильно синтезирующего белок бактерии бруцеллеза, была синтезирована ДНК-плаزمид рНВ 12AAS2TC_124omp16g, содержащая рекомбинантный вирусный ген белка NS1 с последовательностью *Omp16* (GenBank: AAA59360.1). Генетическая конструкция синтезирована в компании «Gene Art Life Technologies», Австрия.

Рекомбинантный векторный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), синтезирующий бруцеллезный

ген, был получен методом трансфекции плазмидами сертифицированных клеток Vero при помощи методики Nucleofector™, «Lonza». Дефицитные по ИФН клетки Vero (Европейская коллекция клеточных культур) совместно трансфицированы с 0,5 мкг/мл плазмидами, кодирующими гены PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M и NS. Трансфицированные клетки исследованы до появления цитопатического действия (ЦПД). После проявления ЦПД надосадочную жидкость центрифугировали при 300 g в течение 15 мин.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах. Куриные эмбрионы заражали суспензией вируса в аллантоисную полость и помещали в термостат для инкубации при 34°C в течение 48 ч. После инкубации куриные эмбрионы помещали в холодильник при -4°C для охлаждения. В качестве объекта исследований в работе использованы 1-й и 5-й пассажные уровни вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Выделение РНК. Вирусную РНК из вирусосодержащей суспензии выделяли с использованием набора QIAmp Viral RNA Mini Kit, «Qiagen».

ПЦР-анализ. Для наработки фрагментов кДНК использовали набор Super Script III One-Step RT-PCR with platinum Taq фирмы «Invitrogen». Амплификацию проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR System 9700, «Applied Biosystems». Параметры амплификации: наработка первой цепи кДНК - 45°C 60 мин, активация полимеразы при 94°C 2 мин, 5 циклов - 94°C 30 с, 45°C 30 с, 68°C 3 мин, 31 цикл - 94°C 30 с, 57°C 30 с, 68°C 3 мин, 68°C 7 мин. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), представлены в таблице.

Секвенирование. Определение первичной нуклеотидной последовательности проводили методом дидеокси-секвенирования с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v 3.1 (ABI) на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, «Applied Biosystems» (США).

Сравнительный компьютерный анализ. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проведен с использованием компьютерных программ Vector NTI и MEGA 4.

Результаты и обсуждение

Согласно литературным источникам, в профилактике бруцеллеза у животных определенное место принадлежит вакцинации [12]. Рекомбинантные вирусы являются кандидатами для производства современных вакцин [13, 14]. Для создания эффективных вакцин, кроме выбора оптимальных протективных факторов, необходима эффективная система доставки, обеспечивающая презентацию гена. В качестве такой системы используется один из аттенуированных штаммов вируса гриппа A/

Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации HA-, NA- и NS-генов рекомбинантного векторного вируса A Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1)

Ген	Праймер	Последовательность
HA	Sc-HA-f	TATTCGTCGAGCTCAGCAAAAGCAGGGG
	Bh-HA-r	ATAGGATCCCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
NA	Xb-NA-f	TATCTAGACAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
	Hd-NA-r	ATAAAGCTTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT
NS	NS-f	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG
	NS-r	CTCTTGCTCCACTTCAAGC

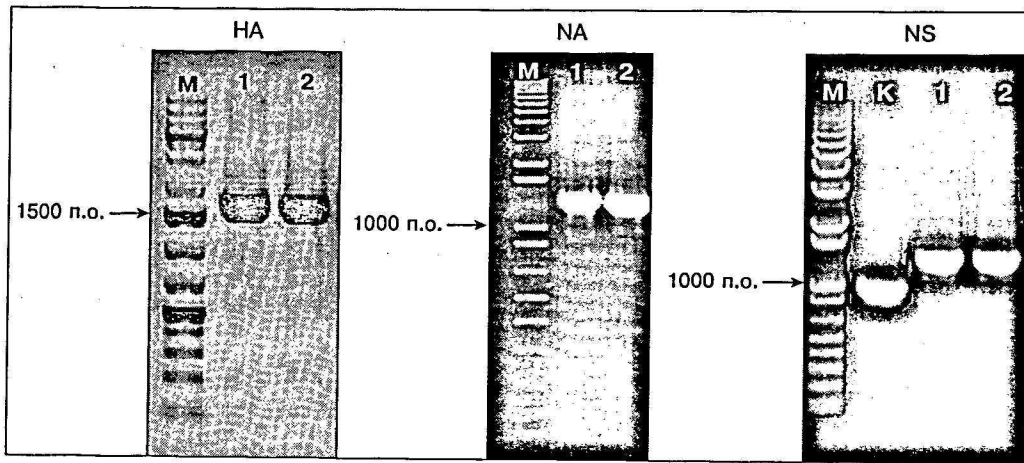


Рис. 1. Электрофоретический профиль разделения амплифицированных генов HA, NA и химерного гена NS рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

HA: M – маркер, «Fermentas»; 1 – HA (1710 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – HA (1710 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня; NA: M – маркер, «Invitrogen»; 1 – NA (1490 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – NA (1490 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня; NS: M – маркер, «Invitrogen»; K – NS A/PR/8/34 (H1N1); 1 – NS (1280 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го пассажного уровня; 2 – NS (1280 п. о.) Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 5-го пассажного уровня.

Puerto Rico/8/34 (H1N1). Для получения рекомбинантного штамма вируса гриппа А, экспрессирующего бруцеллезный ген *Omp16* (GenBank: AAA59360.1), связанный с открытой рамкой считывания гена *NS1*, в качестве исходного штамма был выбран A/Puerto Rico/8-NS1-124 с модифицированным по длине геном *NS*, кодирующим 124 аминокислоты N-терминальной области белка.

Рекомбинантный вирус Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) сконструирован путем котрансфекции культуры клеток Vero, затем адаптирован к 10-суточным ПКЭ. Для подтверждения генетической стабильности генов *NA*, *HA* и *NS* было проведено 5 дополнительных пассажей рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), экспрессирующего бруцеллезный ген *Omp16*.

При создании эффективной вакцины против бруцеллеза немаловажную роль играет идентификация иммуногенных белков. Известно, что при иммунизации мышей белком *Omp16* у них наблюдается повышение активно-

сти цитотоксических лимфоцитов CD4(+), CD8(+), а также Т-клеток [15, 16]. Исходя из этого, в данной работе в качестве бруцеллезного агента был выбран белок *Omp16*, который характеризуется как иммуногенный и защитный антиген. *Omp16* является белком наружной мембраны, представляет собой липопротеин и содержится во всех шести видах и известных биоварах бактерии *Brucella*.

Для проведения генетического анализа были наработаны гены *HA*, *NA* и *NS* 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). Результаты амплификации представлены на рис. 1.

На данном рисунке представлены отдельные полосы HA-, NA- и NS-сегментов рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с химерной конструкцией NS1, содержащей вставку нуклеотидной последовательности гена *Omp16*. Из-за вставки в гене *NS1* бруцеллезного агента *Omp16* ген NS рекомбинантного вируса отличается от гена *NS* вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)

1	GTGCACTCC GAAAGTGGGG GGGAGCAAAA GCAGGGTGAC AAAGACATAA TGGATCCAAA CACTGTGTCA AGCTTTCAGG TAGATTGCTT TCTTTGGCAT CAGCTGGAGG STTCAACCCC CCCTCGTTTT CGTCCSACTG TTTCTGTATT ACSTAGGTTT GTGACACAGT TCGAAAGTCC ATCTAACGAA AGAAACCGTA
101	GTCCGCAAA GAGTTGCAGA CCAAGAATA GGTGATGCC CATTCCTTGA TCGGCTTCGC CGAGATCAGA AATCCCTAAG AGGAAGGGGC AGCACCCCTCG CAGGCCTTTG STCAACGTCT GGTCTTTGAT CCACTACGGG GTAAGGAAC AGCCGAAGCG GCTCTAGTCT TTAGGGATTG TCCTTCCCGG TCGTGGGAGC
201	GTCTGGACAT CGAGACAGCC ACACGTGCTG GAAAGCAGAT AGTGGAGCGG ATTCTGAAAG AAGAATCCGA TGAGGCACCT AAAATGACCA TGGCCCTCTGT CAGACSTGTA GCTCTGTCCG TGTGCACGAC STTTCGTCTA TCACCTCGCC TAAGACTTTC TTCTTAGGCT ACTCCGTGAA TTTTACTGGT ACCGGAGACA
301	ACCTGCGTCC CGTTACSTAA STGACATGAC TCTTGAGGAA ATGTCAAAGG AGTGGTCCAT GCTCATACCC AAGCAGAAA TGGCAGGGCC TCTTTGTATC TGGACGCAGC GCAATGGATT GACTGTACTG AGAAGCTTCT TACAGTTCCT TCACCAGGTA CGAGTATGGG TTCGCTTTC ACCGTCCGGG AGAAACATAG
401	AGAATGGACC AGGCGATCAT GGGAGGATG AGAAGATTG AATCAATAGC AAGATCCCA ATAGCAATAG CACTTTTCAT GTCACTTGCA GTGGCAGGAT TCTTACSTGG TCCGCTAGTA CCCTCCCTAC TCTTCTTAAG TTAGTTATCG TTCTAGTGGT TATCGTTATC GTGAAAAGTA CAGTGAACGT CACCGTCTTA
501	GGCAGTCAA AAGAATCTT CCAACAATG CAGGGGATCT TGGACTTGA GCAGGGGCAG CAACACCAGG ATCATCAAA GATTTCACAG TGAATGTGGG CGCGTAGTTT TTTCTTAGAA GGTTTGTAC GTCCCTTAG ACCTGAACCT GGTCCCGGTC GTTGTGGTCC TAGTAGTCTT CTAAGTGTG ACTTACACCC
601	AGATAGAATA TTCTTGGATC TTGATTATC ACTTATAAGA GCAGATGCAC AACAAACACT TTCAAAACAA GCAGATGGC TTCAAAGATA TCCACAATAT TCTATCTTAT AAGAAGCTAG AACTAAGTAG TGAATATTCT GGTCAAGGTG TTGTTTGTGA AAGTTTGTG CGTGTTACCG AAGCTTCTAT AGGTCTTATA
701	TCAATTCAA TAGAAGGACA TGACAGTAG AGAGGAACA GAGAGTATAA TCTTCCACTT GGACAAGAA GGGCAGGAGC AACAAAGAGAT TTCCTTGCAT AGTTAATGTT ATCTTCTGT ACGTCTACTG TCTCCTTGT CTCTCATATT AGAACGTGA CCTGTTTCTT CCCGTCGTCG TTGTTCTCTA AAGGAACGTA
801	CAAGAGGGGT GCCAACAAAT AGAATGAGAA CAATATCATA TGGAAACGAA AGACCACTGG CAGTGTGCGA CGCAGACACA TGCTGGTCAAG AGAATAGAAG GTTCTCCCA CCGTTGTTA TCTTACTCTT GTTATAGTAT ACCTTTGCTT TCTGGTCAAC GTCACAGCT GCGTCTGTGT AGGACCAAGT TCTTATCTTC
901	GGCAGTGAAC GTGCTTAAAG GGGCTGGAAG ATGATAATAA GCGGCCGC CCCTCACTGT CAGGAATTAC CCCGACCTTC TACTATTATT CCGCCGGC

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность NS1 гена рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1).

78	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
12AAS2TC_124Omp16g													
78	AGGTAGATTGCTTTCTTGGCATGTCCGAAACAGTTCAGACASSAAGAACTAGTGTGATGTCGGCCATCTCTTATCGGCTTCGGCCAGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGTCTCGGA												
43	AGGTAGATTGCTTTCTTGGCATGTCCGAAACAGTTCAGACASSAAGAACTAGTGTGATGTCGGCCATCTCTTATCGGCTTCGGCCAGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGTCTCGGA												
43	AGGTAGATTGCTTTCTTGGCATGTCCGAAACAGTTCAGACASSAAGAACTAGTGTGATGTCGGCCATCTCTTATCGGCTTCGGCCAGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGTCTCGGA												
78	AGGTAGATTGCTTTCTTGGCATGTCCGAAACAGTTCAGACASSAAGAACTAGTGTGATGTCGGCCATCTCTTATCGGCTTCGGCCAGAGATCCGAAATCCSTAAAGAGAGGGGGAGCCACCCCTCGGTCTCGGA												
Consensus													
4													

Рис. 3. Сравнительный анализ NS1 гена рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней с исходной конструкцией 12AAS2TC_124Omp16g.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
NA_A/chicken/Astana/6/2005(FJ390028..1)	*** **
NA_A/AstanaRG/6:2/2009(H5N1)	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16(H5N1)1p	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16(H5N1)5p	*** **

Рис. 4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей NA штаммов вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05(H5N1) (GenBank: FJ390028..1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
NA_FJ390029.1_A/chicken/Astana/6/2005	*** **
NA_A/AstanaRG/6:2/2009(H5N1)	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16(H5N1)1p	*** **
NA_Flu-NS1-124-Omp16(H5N1)5p	*** **

Рис. 5. Выравнивание нуклеотидных последовательностей NA штамма вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029.1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней.

дикого типа (K), увеличенным размером (1280 пар оснований (п. о.)), что было подтверждено результатами электрофореза в агарозном геле продуктов амплификации кДНК. Размеры полученных сегментов NA (1490 п. о.), NA (1710 п. о.) соответствуют размерам цельных сегментов генома вируса гриппа, описанных в литературе [17].

Известно, что делеция NSI-гена критична для репродукции вируса, так как приводит к неполноценной репликации в генетически компетентных организмах. Однако вирусы гриппа, утратившие NS1, могут размножаться в ИФН-дефицитных клеточных линиях, подобных клеткам Vero, накапливаясь до титров, сравнимых с титрами вирусов дикого типа. Исследования показали, что в отличие от вирусов с полностью удаленным геном NS полученные штаммы не утрачивают способность к репродукции в ИФН-компетентных клетках, что связано с присутствием N-терминального РНК-связывающего домена в белке NS1 и частичным сохранением функции белка как антагониста системы ИФН I типа [3, 18].

Было проведено секвенирование нуклеотидной последовательности гена NS1 рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1). Полученная нуклеотидная последовательность представлена на рис. 2.

Как видно из рис. 2, нуклеотидная последовательность гена NS1 рекомбинантного вируса имеет вставку нуклеотидной последовательности гена бруцеллезного белка Omp16 размером 503 п. о., расположенного между нуклеотидными позициями 429 и 932.

При создании вакцины немаловажную роль играет генетическая стабильность рекомбинантного вируса. Для этого оценивали стабильность NS-гена 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с использованием компьютерной программы Vector NTI. Результаты сравнения нуклеотидных последовательностей этих пассажных уровней рекомбинантного вирусного гена NS, содержащего последовательность Omp16 Brucella abortus с исходным участком 12AAS2TC_124Omp16g в ДНК-плазмиде pHW2000, приведены на рис. 3.

Сравнительный генетический анализ показал, что степень сходства химерного гена NS рекомбинантного штамма 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC_124Omp16g, содержащему рекомбинантный вирусный ген белка NS1 с последовательностью Omp16 в составе ДНК-плазмиды pHW2000. Таким образом, нуклеотидная последовательность NS-гена 5-го пассажного варианта штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) не претерпевает каких-либо изменений по сравнению с исходной конструкцией и 1-м пассажным уровнем.

При создании рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) в качестве донора NA и NA использован штамм A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1). Данный штамм был получен методом обратной генетики и представляет собой реассортант высокопатогенного штамма вируса гриппа A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) и виру-

са гриппа A/Puerto Rico/8/34. Так как штамм A/chicken/Astana/6/2005 (H5N1) является высокопатогенным и имеет сайт протеолитического расщепления HA с мотивом повторяющихся аминокислот, была внесена мутация в этот участок путем удаления аминокислотного мотива RRRK [7, 8].

Сегмент HA рекомбинантного вируса имеет последовательность, совпадающую с модифицированным сайтом расщепления сегмента HA вируса гриппа A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) (рис. 4).

Секвенирование и последующий сравнительный анализ последовательности гена, кодирующего HA вируса гриппа A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390028.1), A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) и рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней, подтвердили наличие модификации в сайте расщепления гена HA, т. е. в нуклеотидной последовательности рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) участок нуклеотидной последовательности, отвечающий за патогенность, отсутствует. Таким образом, HA вируса гриппа A/AstanaRG/6:2/2005 (H5N1) и рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) 1-го и 5-го пассажных уровней идентичны на 100%.

На рис. 5 показаны результаты сравнения гена NA рекомбинантного вируса со штаммом A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029.1) и A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1).

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена NA 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами NA штаммов A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) (GenBank: FJ390029.1) и A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) показал, что они не имеют никаких замен в нуклеотидных последовательностях, т. е. идентичны.

В последние годы использование обратной генетики, основанной на применении плазмид, содержащих кДНК-копии фрагментов вирусного генома, позволяет конструировать вакцинные штаммы вируса гриппа путем котрансфекции культуры клеток *Vero*. Метод позволяет исключить риск контаминации вакцинного штамма посторонними инфекционными агентами из неконтролируемых биологических материалов. Указанная технология дает возможность вводить в геном вируса гриппа (посредством сайт-специфического мутагенеза) мутации и делеции, которые придают вирусу полезные свойства высокопродуктивного и аттенуированного штамма, а также вставки чужеродных нуклеотидных последовательностей, кодирующие протективные белки, что обеспечивает создание векторной вакцины [19–21].

Предназначенные для производства вакцинные штаммы вируса гриппа должны соответствовать по антигенной структуре гемагглютинину и нейраминидазе вирусов, доминирующих в Республике Казахстан.

Заключение

Сравнительный генетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность гена NS 1-го и 5-го пассажных уровней вируса Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) на 100% соответствует исходному участку 12AAS2TC_124Omp16g, содержащему химерный вирусный ген белка NS1 с последовательностью Omp16 (GenBank: AAA59360.1) *Brucella abortus* в составе ДНК-плазмиды pHW2000.

В ходе сравнительного генетического анализа установлена 100% идентичность нуклеотидных последовательностей HA- и NA-генов 1-го и 5-го пассажных уровней рекомбинантного штамма Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1) с генами HA и NA штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1).

Для рекомбинантного вируса Flu-NS1-124-Omp16

(H5N1) была продемонстрирована высокая генетическая стабильность. Секвенирование генов HA, NA и NS этого вируса после 5 пассажей на 10-суточных РКЭ показало отсутствие мутаций в данных генах.

Использование в качестве вакцины рекомбинантного аттенуированного вируса гриппа Flu-NS1-124-Omp16 (H5N1), несущего бруцеллезный ген Omp16, может служить перспективным подходом в решении задач разработки нового поколения противобруцеллезных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–6, 10–11, 13–21 см. REFERENCES)

7. Строчков В.М., Червякова О.В., Султанкулова К.Т., Мамадалиев С.М., Зайцев В.Л., Шораева К.А. и др. Рекомбинантные штаммы A/AstanaRG/6:2/2009 и A/AstanaRG/5:3/2009 вируса гриппа, полученные методом обратной генетики. В кн.: *Материалы международной конференции «Современное состояние генетики в Казахстане»*. Алматы; 2010; 63–5.
8. Игнатъева А.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А. А., Забережный А.Д., Алипер Т.И. и др. Высокопродуктивный вирус-реассортант, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу пандемического вируса гриппа A/MOSCOW/01/2009 (H1N1). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (4): 9–14.
9. Готкина Т.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.И. и др. Возможность использования морских свинок как модельных животных для изучения иммунобиологических свойств рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные белки L7/L12 и Omp16. В кн.: *Материалы международной научной конференции молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности»*. Гвардейский; 2013; 47–54.
12. Ставицкий С.Б., Носков А.Н., Кравченко Т.Б. Молекулярная вакцина для профилактики бруцеллеза. Патент РФ № 2285538, 2006.

REFERENCES

1. Racloz V., Schelling E., Chitnis N., Roth F., Zinsstag J. Persistence of brucellosis in pastoral systems. *Rev. Sci. Tech.* 2013; 32 (1): 61–70.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2010). *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. Proc. FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE, May 2009, Rome. FAO Animal Production and Health Proceedings No. 10. FAO, Rome. Available at: www.fao.org/docrep/012/i1402e/i1402e00.pdf (Accessed on 5 April 2013).
3. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6437–41.
4. Fernandez-Sesma A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2007; 7(4): 336–43.
5. Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Kittel C., Sereinig S., Katinger H. et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J. Virol.* 2004; 78: 13037–45.
6. Garcia-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006; 312: 879–82.
7. Strohkov V.M., Chervyakova O.V., Sultankulova K.T., Mamadaliev S.M., Zaytsev V.L., Shoraeva K.A. et al. Recombinant strains A/AstanaRG/6: 2/2009 and A/AstanaRG/5: 3/2009 influenza virus obtained by reverse genetics. In: *Proceedings of International Conference “Current Status of Genetics in Kazakhstan.” [Materialy mezhdunarodnoy konferentsii «Sovremennoe sostoyanie genetiki v Kazakhstane»]*. Алматы; 2010; 63–5. (in Russian)
8. Ignat'eva A.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A. A., Zaberzhnyy A.D., Aliper T.I. et al. A highly reassortant containing the hemagglutinin and neuraminidase pandemic influenza A/MOSCOW/01/2009 (H1N1). *Voprosy virusologii*. 2011; 56 (4): 9–14. (in Russian)
9. Gotskina T.M., Ryskel'dinova Sh.Zh., Asanzhanova N.N., Kydyrbaev Zh.K., Kozhamkulov E.M., Inkarbekov D.I. et al. The possibility of using guinea pigs as an animal model for the study of immunobiological properties of recombinant influenza A viruses expressing brucellosis proteins L7/L12 and Omp16. In: *Proceedings of the International Conference of Young Scientists “Innovative Development of Science in Biological Safety.” [Materialy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii molodykh uchenykh «Innovatsionnoe razvitiye nauki v obespechenii biologicheskoy bezopasnosti»]*. Gvardeyskiy; 2013; 47–54. (in Russian)
10. De Wit E., Spronken M.I., Bestebror T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res.* 2004; 103(1-2): 155–61.
11. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G.

- A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 97(11): 6108–13.
12. Stavitskiy S.B., Noskov A.N., Kravchenko T.B. Molecular Vaccine for Preventive Maintenance Brucellosis. Patent RF № 2285538, 2006. (in Russian).
 13. WHO Guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics. Available at: whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_CSR_GIP_2005.6.pdf.
 14. Leclercq S., Harms J.S., Oliveira S.C. Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2003; 4: 99–107.
 15. Pasquevich K.A., Estein S.M., Garcia Samartino C., Zwerdling A., Coria L.M., Barrionuevo P. et al. Immunization with recombinant *Brucella* spp. outer membrane proteins Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD41 and CD81 T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 2008; 77(1): 436–45.
 16. Luo D., Ni B., Li P., Shi W., Zhang S., Han Y. et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 2006; 74: 2734–41.
 17. Wang X., Li M., Zheng H., Muster T., Palese P., Beg A.A. et al. Influenza A virus protein prevents activation of NFK-B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11566–73.
 18. Kochs G., Martinez-Sobrido L., Lienenklaus S., Weiss S., Garca-Sastre A., Staeheli P. Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (12): 2990–4.
 19. Liu M., Zhang Y., Liu C.G., Pan W.Q., Liu C.N., Yang T. Generation of High-yield vaccine strain wholly derived from Avian Influenza Viruses by Reverse Genetics. *Chin. J. Biotech.* 2006; 22: 720–6.
 20. Stech J., Gam H., Wegmann M., Wagner R., Klenk H.D. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat. Med.* 2005; 11(6): 683–9.
 21. Hoffmann E., Webster R. G. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(12): 2843–7.

Получена 11.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.921.5-036.1-074

Осидак Л. В., Гончар В. В., Волощук Л. В., Головачева Е. Г., Куликова Н. А., Дондурей Е. А., Афанасьева О. И., Суховецкая В. Ф., Милькин К. К., Образцова Е. В., Мушкатина А. Л., Коновалова Н. И., Писарева М. М., Гончарова Е. С., Галкина С. Н., Дринеvский В. П., Го А.

Клинико-лабораторная характеристика гриппа А(H1N1pdm2009) у детей и взрослых в период 2009 – 2013 гг. в Санкт-Петербурге

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 196237, г. Санкт-Петербург

Сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей у 419 детей и 468 взрослых, госпитализированных по поводу гриппа А(H1N1) до и в течение пандемического цикла 2009 - 2013 гг., показал, что клиническая картина пандемического гриппа у пациентов любого возраста, в том числе в постпандемический период, в целом типична для гриппа, а ее характер определяется вовлечением (или отсутствием такового) в процесс легких, причем частота развития пневмоний во все сравниваемые периоды статистически значимо более высокая среди взрослых, чем среди детей. При пандемическом гриппе статистически значимо чаще, чем при сезонном, регистрировали гипертермию ($\geq 39^\circ\text{C}$), геморрагический и диспептический синдромы. Выявлен ряд различий основных характеристик клинической симптоматики пневмоний между выжившими и умершими пациентами с тяжелой формой пандемического гриппа. Установлены закономерности цитокиновых реакций у пациентов любого возраста в зависимости от выраженности интоксикации и наличия осложнений. Доказана лечебная эффективность включения противовирусных химиопрепаратов в комплексную терапию гриппа.

Ключевые слова: грипп А(H1N1pdm2009); дети; пандемия; пневмония; особенность клинической картины.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(4): 23–28.

Osidak L.V., Gonchar V.V., Voloshuk L.V., Golovacheva E.G., Culikova N.A., Dondurey E. A., Afanasjeva O.I., Suhovezkaia V.F., Milkint K.K., Obratsova E.V., Mushkatina A.L., Konovalova N.I., Pisareva M.M., Goncharova E.S., Galkina S.N., Drinevsky V.P., Go A.

Clinical and laboratory presentation of the influenza A (H1N1pdm 2009) in children and adults during the period of 2009-2013 in St. Petersburg

Research Institute of Influenza, 196237, St. Petersburg, Russia

Comparative analysis of the clinical laboratory data from 419 children and 468 adults hospitalized during the pandemic of A (H1N1pdm 2009) and pre- and post-pandemic periods (2010-2013) showed that the clinical presentation of the pandemic influenza in patients of all ages is generally typical for influenza, and its character is determined by the degree of involvement of lungs in the process. Besides, the incidence of pneumonia in adults is statistically significantly higher than in children. During all compared periods hyperthermia ($\geq 39^\circ\text{C}$), hemorrhagic and dyspeptic syndrome were observed. Some differences in the main clinical manifestations of pneumonia in recovered patients and patients who died of the severe pandemic influenza were observed. The regularities of the cytokine reactions depending on the intensity of intoxication and occurrence of complications were determined in patients of all ages. Medical efficacy of inclusion of antiviral chemotherapeutic agents into complex influenza treatment was proved.

Key words: influenza (AH1N1pdm 2009); children; pandemic; pneumonia; peculiarity of clinical presentation.

Citation: *Voprosy virusologii.* 2015; 60(4): 23–28. (In Russ.)

For correspondence: Lyudmila Osidak, MD, PhD, DSc, prof.; e-mail: Lvosidak@mail.ru

Received 17.03.14

Для корреспонденции: Осидак Людмила Викторовна, д-р мед. наук, проф.; e-mail: Lvosidak@mail.ru