

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

КРУТИКОВА
Елена Витальевна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ
ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ У ДЕТЕЙ
В ВОЗРАСТЕ 1–3 ЛЕТ**

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
*на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:

Профессор, д.б.н.
И.В. КИСЕЛЕВА

Санкт-Петербург
2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Вирусы гриппа. Общая характеристика	13
1.1.1 Структура вириона и геном вирусов гриппа А, В, С и D	13
1.1.2 Репликация вируса гриппа в чувствительной клетке	14
1.2 Антигенная изменчивость вирусов гриппа	15
1.2.1 Генетическая реассортация.....	15
1.2.2 Антигенный шифт.....	16
1.2.3 Антигенный дрейф	16
1.3 Профилактика инфекций вызванных вирусами гриппа	16
1.3.1 Живые холодадаптированные гриппозные вакцины	17
1.3.2 Инактивированные вакцины.....	18
1.3.3 Противовирусные препараты	18
1.4 Механизмы аттенуации вируса гриппа	19
1.4.1 Доноры аттенуации	20
1.4.2 Маркеры аттенуации холодадаптированных штаммов	21
1.4.3 Роль генов в аттенуации вирусов гриппа.....	23
1.5 Испытания доноров аттенуации для подготовки живой гриппозной вакцины типа В.....	24
1.6 Модели животных для изучения вируса гриппа	27
1.6.1 Модели для изучения патогенеза гриппозной инфекции.....	30
1.6.2 Модели для изучения трансмиссивности вируса гриппа	31
1.7 Заключение	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
2.1 Вирусологические методы	33
2.2 Методы работы с лабораторными животными.....	34
2.3. Серологические методы	36
2.4. Молекулярно–биологические методы	36
2.5 Статистическая обработка данных	39
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
ГЛАВА 3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ДОНОР АТТЕНУАЦИИ В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ РЕАССОРТАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОДНОГО ГОДА И СТАРШЕ	40
3. 1 Клонирование донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и отбор перспективных клонов	41
3.2 Выявление аттенуирующих мутаций в последовательности альтернативного донора аттенуации В14/710	42
3.3 Сравнительная характеристика доноров В14/710 и В/СССР/60/69	43

3.4 Иммуногенность реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на вирусе В/14/710, в эксперименте на мышах	44
ГЛАВА 4. ЭКСПРЕСС-СКРИНИНГ РЕАССОРТАНТОВ ВИРУСА ГРИППА ТИПА В МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ	46
4.1. Разработка протокола пиросеквенирования для генотипирования реассортантов живой гриппозной вакцины путем анализа коротких участков последовательности с использованием PyroMark Q24.....	46
4.2. Отработка протокола пиросеквенирования для выявления нуклеотидной последовательности на выбранном вариабельном участке генома доноров аттенуации и диких вирусов.....	48
4.3. Генотипирование реассортантов.....	51
ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АТТЕНУАЦИИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА В.....	54
5.1 Получение реассортантных штаммов вируса гриппа В на основе альтернативного донора В14/710.....	54
5.2 Роль генов в формировании температурочувствительного фенотипа альтернативного донора В14/710	55
5.3 Роль генов в формировании аттенуирующих свойств вирусов гриппа В	56
5.4 Влияние мутаций в гене PB1 на формирование аттенуирующих свойств донора В14/710	57
ГЛАВА 6. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОТЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ СОДЕРЖАЩЕЙ АНТИГЕННО ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ЛИНИИ ВИРУСА ГРИППА В.....	59
6.1 Кросс–протективность живой гриппозной моновалентной вакцины типа В.....	60
6.1.1 Оценка степени аттенуации моновалентной живой гриппозной вакцины типа В на модели хорьков	60
6.1.2 Оценка защитных свойств моновалентной живой гриппозной вакцины типа В на модели хорьков в челлендж-эксперименте.....	62
6.1.3 Оценка уровня гуморального иммунного ответа в сыворотках крови хорьков в челлендж-эксперименте	64
6.2 Кросс–протективность живой гриппозной трехвалентной вакцины.....	64
6.2.1 Оценка степени аттенуации живой гриппозной трехвалентной вакцины на модели хорьков.....	65
6.2.2 Оценка защитных свойств живой гриппозной трехвалентной вакцины на модели хорьков в челлендж-эксперименте.....	67
6.2.3 Оценка уровня гуморального иммунного ответа в сыворотках крови хорьков	71
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ	73
РАЗДЕЛ III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ВЫВОДЫ.....	85
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	100

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно последним оценкам Всемирной организации здравоохранения (WHO) и Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC), грипп ежегодно приводит к тяжелым заболеваниям от 3 до 5 миллионов человек во всем мире, из которых умирают до 650 тысяч человек. Большинство случаев смертности происходит среди лиц старше 75 лет и детей младше 5 лет [49, 185].

Наиболее уязвимым контингентом, восприимчивым к гриппозной инфекции, являются маленькие дети, особенно в первые годы жизни [126]. Заболеваемость среди детей младшего возраста отличается высокой контагиозностью, трансмиссивностью и частыми случаями осложнений, иногда заканчивающихся летальным исходом [70, 126]. Кроме того, у детей в раннем возрасте трудно диагностировать грипп ввиду отсутствия конкретных признаков, жалоб или симптомов заболевания, что может привести к неэффективному лечению и осложнениям [75].

По мнению специалистов WHO, вакцинация остается наиболее эффективным методом защиты от гриппозной инфекции [184]. Существующие коммерческие противогриппозные вакцины подразделяются на инактивированные (ИГВ) и живые (ЖГВ). При вакцинации живой гриппозной вакциной развивается имитация инфекции в легкой форме со стимуляцией тех же звеньев иммунного ответа, что и при заболевании гриппом, что позволяет достичь формирования иммунитета, аналогичного естественному, с широким защитным потенциалом, в том числе местного иммунного ответа во входных воротах инфекции [6, 11, 33, 58, 89, 138, 149, 151]. В отличие от ЖГВ, инактивированная вакцина стимулирует иммунный ответ только к штамму, против которого она была сконструирована.

В США применение ЖГВ FluMist разрешено для здоровых детей с двух лет и взрослых до 49 лет [48], ИГВ для детей с противопоказаниями – с шести месяцев. Что касается России, то вакцинация ИГВ, также, как и за рубежом, начинается в шесть месяцев [19], а ЖГВ разрешена для всех возрастных групп, начиная с трех лет и старше [182].

До 2003 года в России производились два препарата ЖГВ, – это вакцина для детей в возрасте от трех до шестнадцати лет, применяемая двукратно и вакцина для взрослых, применяемая однократно. Детский вариант вакцины готовился на донорах аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) (А/Лен/47) и В/СССР/60/69 (В60), «взрослая» вакцина – на донорах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (А/Лен/17) и В/СССР/60/69. Однако, в результате целого ряда клинических наблюдений за безопасностью, стабильностью и иммуногенностью вакцины

для взрослых (на детях от 3 до 6 лет и от 7 до 14 лет), была обоснована возможность однократного применения взрослого варианта ЖГВ на детях с трех лет [10, 12]. Поэтому, современная отечественная ЖГВ производится на основе доноров А/Лен/17 и В60 в виде единого препарата для всех возрастных групп населения, начиная с трех лет [182].

При первом контакте иммунной системы человека с антигеном в виде вакцинного штамма или эпидемического вируса происходит так называемый иммунологический импринтинг («антигенный грех») [39, 47], который заключается в том, что при следующем контакте с этим антигеном или антигеном той же филогенетической группы активируются В–клетки памяти и преимущественно вырабатываются антитела в отношении самого первого антигена. Известно, что при иммунизации инактивированными вакцинами иммунный ответ вырабатывается преимущественно на иммунодоминантные участки молекулы гемагглютинина, которые также являются гипервариабельными [169]. Соответственно, при первой иммунизации серонегативных детей инактивированной вакциной, и последующем контакте с мутировавшим вирусом гриппа, будут вырабатываться антитела, направленные не на новый инфекционный агент, а на общие у двух штаммов вариабельные участки гемагглютинина введенной инактивированной вакцины. В отличие от инактивированных вакцин, живые гриппозные вакцины имитируют натуральную гриппозную инфекцию, формируя В– и Т–клетки памяти не только к вариабельным, но и к консервативным участкам вирусных белков, которые, что наиболее важно, локализуются непосредственно в органах респираторной системы (легкие, назо–ассоциированная лимфоидная ткань и др.) и обеспечивают быструю элиминацию вирулентного вируса [169]. Именно поэтому важно, чтобы в самый первый раз дети контактировали именно с живым вирусом, причем одновременно со всеми циркулирующими сероподтипами (H1N1, H3N2, В), обеспечивая формирование иммунологической памяти к широкому спектру консервативных вирусных эпитопов. Сформировав такой сбалансированный «иммунологический отпечаток» в первые годы жизни, при последующей вакцинации или натуральной инфекции любым штаммом вируса гриппа будут быстро активироваться клетки иммунологической памяти, направленные на перекрестно–реагирующие эпитопы, обеспечивая кросс–протекцию. В этой связи ВОЗ подняла вопрос о необходимости начала вакцинации против гриппа живыми гриппозными вакцинами детей в возрасте одного года [186].

Дети первого года жизни защищены естественным пассивным материнским иммунитетом. Вакцинация ИГВ разрешена начиная с 6–месячного возраста, а отечественной ЖГВ – с трех лет. Таким образом, если говорить о необходимости первой иммунизации именно живой гриппозной вакциной, группа детей от одного года до трех лет остается незащищенной. Противогриппозная вакцинопрофилактика живой гриппозной вакциной детей в возрасте от 1 до 3 лет значительно снизила бы среди них заболеваемость гриппом. В связи с этим, очень важным,

не охваченным на настоящий день звеном профилактики гриппозной инфекции, является разработка ЖГВ, наиболее эффективной для защиты детей первых трех лет жизни.

Для усовершенствования ЖГВ и повышения ее эффективности необходимо понимание всех аспектов защиты населения от циркулирующих штаммов. В последние годы все чаще социркулируют две антигенно отличающихся линии вируса гриппа В – В/Victoria/2/87–подобные вирусы (В/Vic) и В/Yamagata/2/78–подобные вирусы (В/Yam). [121, 163, 191]. Поскольку в состав сезонной трехвалентной вакцины (Т–ЖГВ) входит лишь один генетический вариант вируса гриппа В, несоответствие вакцинного и циркулирующего штаммов может существенно снизить защитный эффект вакцинного препарата. Включение в состав гриппозных вакцин четырех штаммов вируса гриппа (так называемая четырехвалентная, или квадριвалентная вакцина), позволило бы избежать несоответствия между входящими в состав вакцины и циркулирующими штаммами вируса гриппа В [76]. В 2012 году WHO впервые рекомендовала одновременное включение в состав гриппозных вакцин двух антигенных вариантов вируса гриппа В как альтернативу трехвалентной вакцине [183]. Тем не менее, трехвалентная вакцина до сих пор применяется во многих странах, поскольку разработка и применение квадριвалентной вакцины (К–ЖГВ) ограничиваются рядом факторов, таких, как требования регулирующих органов, увеличение времени и стоимости производства, рост цены на вакцину и пр. [42].

Сложившаяся ситуация остро поставила вопрос об изучении потенциала перекрестной защиты трехвалентных вакцин, содержащих антигенно отличающиеся от циркулирующих штаммы вирусов гриппа В [37, 192].

Расширение сферы применения современной живой гриппозной вакцины, способной охватить самые широкие слои населения и защитить их от гриппозной инфекции даже в случае неполного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа типа В является актуальной проблемой современной клинической вирусологии.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ

В 1960–х годах в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины (ИЭМ) методом длительного холодого пассирования в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) был подготовлен целый ряд холодоадаптированных (ХА) пассажных штаммов (А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), А/Лен/47, А/Лен/17, А/Виктория/35/30/72 (H3N2), В/СССР/60/69 (В60), В/Ленинград/14/17/55 (В14), В/Душанбе/1/62/66 и др.). На основе этих штаммов были подготовлены и испытаны в клинических наблюдениях, живые гриппозные вакцины на маленьких детях (от года) и на взрослых [1, 6, 31]. Затем, после разработки метода реассортации эти штаммы начали тестировать в качестве доноров аттенуации для ЖГВ нового поколения – реассортантной [1, 18, 24, 133].

В России до 2003 года применялись два вида живых вакцин – для взрослых на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 и для детей на основе более аттенуированного донора А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. После того, как было доказано, что А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) можно использовать в качестве единого донора аттенуации для подготовки компонента ЖГВ типа А [10, 12, 150], с 2003 года применяется единая трехвалентная реассортантная ЖГВ для всех групп населения старше трех лет на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69.

Технология производства отечественной живой гриппозной вакцины была передана в Индию и Китай в рамках договора с WHO о «Подготовке новых вакцинных штаммов для сезонных и пандемических живых гриппозных вакцин для развивающихся стран». В Индии эта вакцина под названием «Nasovac-S» уже зарегистрирована для применения у всех возрастных групп, начиная с 2 лет. Что касается России, в свое время ХА донор А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) успешно применялся в качестве ЖГВ для иммунизации детей в возрасте одного года [1, 6, 31]. Донор аттенуации В60 в масштабных клинических наблюдениях был апробирован в основном на детях с трехлетнего возраста [6, 8] и только в одном исследовании – на детях от двух лет [136], поэтому применение отечественной ЖГВ, основанной на доноре В60, у детей в возрасте от одного года пока невозможно. Поскольку существует необходимость прививать от гриппа детей этой возрастной группы, должны быть проведены исследования, связанные с созданием и изучением донора ЖГВ типа В для самых маленьких детей.

Штамм В/Ленинград/14/17/55, пройдя масштабные клинические исследования на тысячах детей от одного года до 15 лет [1, 6, 31], мог бы стать перспективным донором при подготовке штаммов ЖГВ для детей одного года и старше. Однако, его изучение прекратилось в 1990-е годы, поэтому к началу нашей работы он не был до конца охарактеризован. Так, не была установлена его нуклеотидная и аминокислотная последовательность, что является важной характеристикой донора, поскольку количество и место расположения мутаций во внутренних генах донора определяет его аттенуирующие (*att*) свойства. Штамм В14 не был клонирован, а чистота популяции штамма является гарантией его безвредности. К тому же, не была установлена роль отдельных мутаций в аттенуации вируса В14.

Механизмы аттенуации ХА доноров аттенуации типа А детально изучены как в экспериментах *in vitro*, так и в системе *in vivo* [34, 74, 82, 87, 88, 94]. Степень изученности молекулярных основ аттенуации ХА вирусов гриппа В значительно уступает информации, полученной для вирусов гриппа А. Для них также изучалась роль генов в их аттенуации, но в основном эксперименты проводилось в системе *in vitro*. Была показана ключевая роль PB2 и PA генов в формировании температурочувствительного (*ts*) фенотипа донора В60 [16, 78, 180]. При изучении механизмов аттенуации корейского донора В/Lee/40ca были опубликованы данные,

касающиеся только описания фенотипа вируса, без информации о конкретных генетических позициях, ответственных за его аттенуацию [38]. Что же касается изучения роли отдельных генов в аттенуации ХА вирусов гриппа В на лабораторных животных, то такие исследования проводились только для американского донора аттенуации В/Ann Arbor/1/66са [78].

Все вышесказанное объясняет причину того, почему в современных условиях в настоящей стадии изученности, без проведения всестороннего анализа молекулярно–биологических характеристик ХА штамм В/Ленинград/14/17/55 пока невозможно использовать в качестве донора аттенуации.

Определение состава генома реассортантов занимает важное место в процессе подготовки штаммов ЖГВ. Анализ реассортантов–кандидатов в вакцинные штаммы проводится с использованием различных методов: рестрикционный анализ [96, 99], мультиплексная ПЦР [73], секвенирование [152] и частичное секвенирование [119]. У каждого метода есть свои преимущества и недостатки. Основными ограничениями методов рестрикционного анализа и мультиплексной ПЦР является оценка результатов косвенным путем – по размеру фрагментов на электрофореграмме, что подразумевает возможность получения ложных результатов. Полное или частичное секвенирование исключает получение ложных результатов, однако, анализ реассортантов требует применения дорогостоящих реактивов и значительных трудозатрат, в связи с чем малоприспособно для рутинного анализа большого числа образцов. В связи с этим необходимо разработать альтернативный, высокоскоростной и недорогой метод первичного скрининга вакцинных кандидатов.

В последние годы в мире сложилась уникальная ситуация, при которой в разных районах земного шара одновременно циркулируют обе генетические линии вируса гриппа В – В/Vic и В/Yam, не говоря уже о реассортантах с поверхностными гликопротеинами, унаследованными от разных линий [121, 163, 191]. Такие эволюционные особенности вирусов гриппа В определяют особый интерес, проявляемый к применению К–ЖГВ. Однако, добавление еще одного компонента в состав Т–ЖГВ с одной стороны сопровождается удорожанием производства и, как следствие, повышением стоимости препарата, а с другой вызывает опасения возможной интерференции вакцинных штаммов. Поэтому вопрос об эффективности Т–ЖГВ в случае неполного антигенного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа В остается актуальным.

Опубликован ряд работ, позволяющих в результате продемонстрированной кросс–протективности положительно оценить перспективы использования Т–ЖГВ, содержащей антигенно отличающиеся от циркулирующих штаммов вакцинные компоненты вируса гриппа В [84, 102]. В России подобные исследования пока не проводились.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что углубленное изучение вакцинных компонентов типа В трехвалентной ЖГВ расширит перспективы повышения ее эффективности и дальнейшей модернизации.

Ко времени начала наших исследований ряд вопросов требовал изучения, в частности:

1. Подбор и характеристика ХА альтернативного донора аттенуации В14 для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте одного года и старше.
2. Установление молекулярных механизмов аттенуации ХА донора, подготовленного на основе резервного вируса В14, на модели *in vitro* и *in vivo*.
3. Отработка эффективного, информативного и малозатратного метода определения состава генома реассортантов при подготовке штаммов ЖГВ.
4. Изучение возможной перекрестной протективности Т–ЖГВ на модели хорьков.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с вышесказанным, ЦЕЛЬЮ настоящей работы явилась усовершенствование донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В для детей в возрасте 1–3 лет.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие ЗАДАЧИ:

1. Получить клонированный вариант резервного донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и охарактеризовать его фенотипические и молекулярно–генетические особенности и иммуногенность с целью возможного использования при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины для детей в возрасте 1–3 лет.
2. Модифицировать метод пиросеквенирования для оперативной оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.
3. Изучить механизмы аттенуации донора В/Ленинград/14/17/55.
4. Изучить перекрестную протективность живых моно– и трехвалентных гриппозных вакцин, содержащих антигенно отличающиеся линии вируса гриппа В.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые получен и полностью охарактеризован клон В14/710 донора аттенуации ЖГВ, подготовленный на основе ХА вируса В/Ленинград/14/17/55, с целью его возможного использования в качестве резервного донора при подготовке вакцинных штаммов для детей в возрасте 1–3 лет. Впервые получены данные о локализации мутаций в геноме альтернативного донора В14/710; выявлено 17 уникальных аминокислотных замен в его внутренних генах. Впервые установлена роль полимеразных генов альтернативного донора В14/710 в формировании его *ts* фенотипа и аттенуации для животных. Модифицирован метод пиросеквенирования и впервые применен для оценки состава генома реассортантов при подготовке отечественных штаммов ЖГВ типа В. На модели мышей установлена

иммуногенность реассортантных штаммов, подготовленных на основе альтернативного донора В14/710, не уступающая иммуногенности аналогичных вакцинных штаммов, подготовленных на основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69. Продемонстрирована перспективность использования мышей как модели для сравнительного анализа степени аттенуации различных вирусов гриппа. На модели хорьков продемонстрирована перекрестная защита между линиями вируса гриппа В В/Vic и В/Yam, входящими в состав живой гриппозной вакцины.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Работа включает как фундаментальные, так и практические аспекты. Получен и экспериментально охарактеризован резервный донор аттенуации В14/710, содержащий на 10 кодирующих мутаций больше, чем базовый донор В60, и более аттенуированный, что делает его перспективным донором аттенуации штаммов ЖГВ, предназначенной для детей в возрасте одного года и старше.

Получены данные о влиянии генов, кодирующих белки полимеразного комплекса, а именно генов PB2 и PA, на аттенуацию альтернативного донора В14/710, что вносит существенный вклад в понимание фундаментальных аспектов аттенуации вируса гриппа В в целом.

Модифицированная тест–система метода определения состава генома реассортантов вируса гриппа В в 2–3 раза ускоряет и удешевляет процесс подготовки штаммов ЖГВ.

Показано, что мыши являются адекватной моделью для изучения различий в степени аттенуации вирусов гриппа.

В доклинических исследованиях на хорьках охарактеризованы моно– и трехвалентные ЖГВ, в результате чего была показана перекрестная защита между линиями вируса гриппа В/Vic и В/Yam. При этом вакцины, содержащие вирусы гриппа Викторианской линии, более эффективно защищали животных от челленджа диким вирусом гриппа В линии Ямагата.

Подготовленный автором вакцинный штамм В/60/Пхукет/2013/26 депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России (НИИ вирусологии №2808), передан в АО «НПО «Микроген» для включения в состав ЖГВ и использовался в эпидемический по гриппу сезон 2015–2016 гг. Штамм также был передан в WHO в рамках договора о «Подготовке новых вакцинных штаммов для сезонных и пандемических живых гриппозных вакцин для развивающихся стран».

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология исследования представляет собой алгоритм достижения поставленной в диссертационной работе цели и включает в себя набор приемов и методов, как классических

(вирусологических, серологических и молекулярно–биологических), так и авторскую методику оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Из гетерогенной популяции резервного донора В/Ленинград/14/17/55 выделен и методами фенотипического, молекулярно–генетического и серологического анализа охарактеризован клон В14/710, перспективный для использования в качестве альтернативного донора для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте одного года и старше.

2. Гены, кодирующие внутренние белки вируса В14/710, содержат 17 кодирующих мутаций, что на 10 аминокислотных замен больше, чем у базового донора В/СССР/60/69. Это является основой для более выраженной аттенуации вируса В14/710 по сравнению с донором В/СССР/60/69, продемонстрированной в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

3. Гены, кодирующие полимеразный комплекс, участвуют в формировании *ts* и *att* фенотипа альтернативного донора аттенуации В14/710. Сочетание генов PB2 и PA донора В14/710 в геноме реассортантов приводит к их температурочувствительности и аттенуации для животных, что позволяет предположить существование единого механизма аттенуации ХА вирусов гриппа В.

4. Модифицированный метод пиросеквенирования позволяет на 2–3 дня сократить анализ генома вируса гриппа В и в 2 раза удешевить анализ реассортантов при подготовке штаммов ЖГВ типа В по сравнению с применяемыми ранее методами.

5. В экспериментах на хорьках вакцинные штаммы вируса гриппа В вызывают перекрестную защиту от инфекции, вызванной гетерологичными линиями В/Vic и В/Yam, как в виде моновалентной ЖГВ, так и в составе Т–ЖГВ.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается значительным объемом исследований, проведенных с использованием современных средств и методик и статистической обработкой полученных данных. Результаты проделанной работы были представлены на 14 международных и российских конференциях: на XIX–й, XX–XXII–й Международной медико–биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (СПб, 2016–2019); на XX–й, XXI–XXIII–й Международной Пущинской школе–конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016–2019); на XXI–й и XXII–й Санкт–Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов «Правительство Санкт–Петербурга комитет по науке и высшей школе» (СПб, 2016, 2019); на IX– X–ой Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017-2018» (Москва,

2017, 2018); на VII-м Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения–2017» (СПб, 2017); на 6-й конференции Европейской научной рабочей группы по гриппу (ESWI) (Рига, Латвия, 2017); на Оксфордской конференции по гриппу (Оксфорд, Великобритания, 2018), на 10-й Конференции по контролю за гриппом (Options X, Сингапур, 2019), а также регулярно заслушивались на заседаниях отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» (2014–2019).

ПУБЛИКАЦИИ

Основные результаты диссертации опубликованы в 19 научных статьях 11 из которых, представлены в журналах входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ и 9 индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus. По теме диссертации получен 1 патент и опубликовано 22 тезиса российских и международных конференций.

РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирусы гриппа. Общая характеристика

Вирус гриппа, принадлежащий к семейству *Orthomyxoviridae*, имеет негативный сегментированный РНК геном. На основании антигенных различий вирусы гриппа относят к четырем типам: А, В, С и D.

Вирусы гриппа А разделяется на сероподтипы. В настоящее время известно 18 подтипов гемагглютинаина (НА) и 11 подтипов нейраминидазы (НА) [50]. Вирусы гриппа В, С и D на сероподтипы не делятся. Однако, в начале 70х годов [148] произошло разделение вирусов гриппа В на две антигенно различные линии, представителями которых являются - В/Yamagata/16/88-подобные и В/Victoria/2/87-подобные вирусы. Среди вирусов гриппа С насчитывается шесть генетических линий: С/Taylor/1233/47-подобные, С/Aichi/1/81-подобные, С/Sao Paulo/378/82-подобные, С/Kanagawa/1/76-подобные, С/Yamagata/26/81-подобные и С/Mississippi/80-подобные вирусы [127]. В свою очередь, вирус гриппа D разделяется на две генетически различные линии: D/swine/Oklahoma/13342011, D/bovine/Oklahoma/660/2013 [55].

Вирусы гриппа А поражают не только человека, но и ряд млекопитающих и птиц [50]. До настоящего времени считалось, что вирусы гриппа В способны только к инфицированию людей, однако последние данные продемонстрировали возможность инфицирования и животных (свиней, тюленей и др.) [178]. Вирусы гриппа С в первую очередь вызывают инфекции у людей [118]. Симптомы при инфицировании вирусом гриппа С, схожи с симптомами при заболевании, вызванном вирусами гриппа В. Для них характерны слабо выраженные клинические симптомы, но также существует вероятность осложнений, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом. О вирусах гриппа D известно мало, поскольку они были открыты относительно недавно. Известно, что они отличаются от вирусов гриппа А и В, а по своей структуре похожи на вирусы гриппа С [118]. Вирус гриппа D изолирован от крупного рогатого скота и инфицирует в основном его и в меньшей степени свиней [168].

1.1.1 Структура вириона и геном вирусов гриппа А, В, С и D

Вирионы вирусов гриппа А и В имеет шаровидную или нитевидную форму. Геном вируса представлен антисмысловой (негативной) одноцепочечной РНК и состоит из восьми сегментов. Каждый сегмент генома вируса гриппа связан с РНК-зависимой-РНК-полимеразой. РНК

полимераза вируса гриппа состоит из трех белков (субъединиц) - это белки PB2, PB1 и PA. В структуре вириона сегменты РНК связаны с нуклеопротеином и образуют рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP). RNP комплекс играет важную роль в жизненном цикле вирусов и в адаптации к новому хозяину, он отвечает за вирусную транскрипцию, репликацию и за сборку сегментов генома в вирионы потомства.

Вирионы вирусов гриппа покрыты липидной оболочкой, в которую встроены вирусные гликопротеины - гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA) и белок, формирующий ионные каналы M2. У вируса гриппа В, кроме ионного канала VM2, также имеется ионный канал в липидной оболочке, образованный белком NB. Липидная оболочка обволакивает вирусный капсид, сформированный белком M1, внутри которого находится RNP комплекс.

Геном вирусов гриппа С и D состоит из семи сегментов. В отличие от вирусов гриппа А и В, у вирусов гриппа С и D поверхностные белки HA и NA заменяет один белок, выполняющий сходные функции – HEF (hemagglutinin-esterase-fusion). Это вызывает беспокойство у ученых, поскольку поверхностный антиген HEF вирусов гриппа D структурно и функционально аналогичен антигену HEF вирусов гриппа С, существует потенциальная угроза зоонозного вируса гриппа D для общественного здравоохранения [167].

Поверхностный HEF белок вирусов гриппа С и D выполняет те же функции, что HA и NA вирусов гриппа А и В, а именно: связывается с сиаловой кислотой клетки хозяина, обеспечивает специфическое распознавание рецепторов и играет важную роль в выходе вирусной частицы в цитоплазму клетки из эндосомы [167].

1.1.2 Репликация вируса гриппа в чувствительной клетке

Начальным этапом цикла репликации вируса гриппа является адсорбция вириона на поверхности клетки. При этом HA вируса гриппа, посредством рецептор-связывающего кармана связывает остаток сиаловой кислоты на клеточном олигосахариде [165]. HA вируса гриппа специфически распознает α -2-3 и α -2-6 связи, которые преобладают на эпителиальных клетках верхних (ВДП) или нижних (НДП) дыхательных путей. После адсорбции вириона, вирусная частица попадает внутрь клетки посредством рецептор опосредованного эндоцитоза. При этом вирусная частица подвергается воздействию кислой среды ($pH=5,0-6,0$), что приводит к структурным изменениям HA и слиянию оболочки вируса с эндосомой. В результате чего, молекула HA расцепляется на две субъединицы и через канал M2 происходит перекачка ионов H^+ из эндосомы в вирион, что в свою очередь, обеспечивает транспорт генетического материала в цитоплазму клетки. Затем вирион транспортируется и в ядро клетки [79].

Далее начинается процесс транскрипции, с получением мРНК с помощью РНК-зависимой РНК полимеразы. В процессе репликации с генетических сегментов, состоящих из

антисмысловой РНК, вирусной полимеразой считываются (+) смысловые копии, которые служат матрицей для синтеза антисмысловых генетических сегментов, предназначенных для упаковки в новые вирионы. Далее мРНК экспортируются из ядра клетки в цитоплазму, где происходит трансляция вирусспецифических белков [107].

Сборка вирионов осуществляется в цитоплазме клетки, в данном процессе задействованы белки NP и M1. РНК-комплексы перемещаются из ядра клетки в цитоплазму и в процессе выхода приобретают оболочку с HA, NA и M2. Далее вирион освобождается за счет отщепления сиаловой кислоты NA [107].

1.2 Антигенная изменчивость вирусов гриппа

Основными механизмами, лежащими в основе изменчивости вирусов гриппа, являются мутации и обмен сегментами генома (реассортация). Изменения в поверхностных гликопротеинах HA, NA и NEP приводят к появлению антигенно новых вариантов вирусов и позволяют вирусам ускользнуть от иммунного ответа хозяина. Также поверхностные белки вируса гриппа отвечают за взаимодействие с клеткой хозяина, а мутации в этих белках могут привести к изменению круга хозяев вируса [116, 167].

1.2.1 Генетическая реассортация

Сегментированность генома вируса гриппа обеспечивает возможность генетической реассортации – обмена сегментами генома между разными вирусами гриппа одного типа. Это происходит при одновременном инфицировании клетки разными штаммами вируса гриппа. При генетической реассортации возникает новый вариант вируса гриппа, который унаследовал часть генов от одного родительского вируса, часть - от другого.

Механизмы генетической реассортации до конца не изучены, поскольку неясно, на каком именно этапе жизненного цикла вируса она происходит. Реассортация может возникать в ядре во время репликации, во время экспорта РНК из ядра в цитоплазму, в цитоплазме клетки [115]. Генетическая реассортация вирусов гриппа приводит к появлению новых вариантов вируса гриппа, которые могут приобрести эпидемический или даже пандемический характер распространения. Так, в 1957 и 1968 годах циркуляция двух вариантов - человеческого и свиного гриппа привела к реассортации между ними, реассортанты получили широкое распространение среди людей, что впоследствии привело к пандемии [153, 154, 190]. Также в результате реассортации в 2009 году возник пандемический вариант вируса гриппа A/H1N1pdm09, когда новый штамм вируса гриппа приобрел гены сразу от четырех родителей - от человеческого вируса, птичьего и двух видов свиней [129, 130, 177].

На сегодняшний день генетическая реассортация у вирусов гриппа В и С не является основным аспектом в эволюции этих вирусов, однако имеет место быть [43, 117, 140]. Реассортация вирусов гриппа В в главной степени связана с обменом поверхностными генами между двумя различными линиями вирусов гриппа В. Еще в 1992 году в США появился вирус В/Houston/1/92, НА которого принадлежал линии Ямагата, а NA линии Виктория [121]. Похожие вирусы с поверхностными генами от двух различных линий вирусов гриппа В были зарегистрированы и в 2002 и в 2016 годах [121, 163, 175, 191].

1.2.2 Антигенный шифт

Антигенный шифт – это вид генетической изменчивости, включающий в себя замену одного гена или сразу нескольких сегментов РНК вируса гриппа. Механизмом, за счет которого осуществляется антигенный шифт, является генетическая реассортация (см. раздел 1.2.1), в сочетании с адаптивными мутациями вируса гриппа [187]. Например, при замене поверхностных гликопротеинов, внутренние белки вируса гриппа остаются прежними, а новые, измененные НА и NA обеспечивают распространение инфекции [181]. Этот вид изменчивости описан главным образом для вирусов гриппа А, у вирусов гриппа В такое свойство отсутствует, так как у вирусов гриппа типа В основным хозяином является человек [135, 137].

1.2.3 Антигенный дрейф

Антигенный дрейф – это вид мутационной изменчивости вируса гриппа, который обуславливается плавным накоплением точечных мутаций в НА и NA, что в дальнейшем может привести к изменению основных эпитопов этих гликопротеинов [181]. Такой вид изменчивости вируса гриппа возникает из-за однотипности молекул поверхностных белков вируса гриппа, которых недостаточно для преодоления иммунных факторов организма. Дрейф, приводящий к замене отдельных аминокислот в НА и NA, позволяет мутантному вирусу преодолевать иммунный ответ и распространяться среди населения [5]. Такая эволюционная изменчивость происходит как у вирусов гриппа А, так и у вирусов гриппа В. Совместная циркуляция двух генетически различных линий вируса гриппа В, В/Yamagata/16/88 и В/Victoria/2/87, привела к накоплению точечных мутаций и к новому генетическому разнообразию вирусов гриппа В [106].

1.3 Профилактика инфекций вызванных вирусами гриппа

Многочисленные антигенные изменения вируса гриппа приводят к сезонным вспышкам, эпидемиям и даже пандемиям гриппа. Заболеваемость гриппом особенно высока в организованных группах. Среди лиц с ослабленной иммунной системой, детей и лиц пожилого возраста высока вероятность развития осложнений гриппозной инфекции, вплоть до летального исхода. Ежегодный социально-экономический ущерб от эпидемий гриппа делает эту инфекцию

одной из ведущих проблем здравоохранения, в связи с чем, вопрос профилактики гриппозной инфекции стоит особенно остро.

1.3.1 Живые холодадаптированные гриппозные вакцины

За долгое время борьбы с гриппозной инфекцией, не было открыто ничего более эффективного, чем вакцинопрофилактика, особенно для людей, входящих в группу риска - это пожилые люди, беременные женщины, медицинские работники и маленькие дети.

Живые холодадаптированные гриппозные вакцины – это аттенуированные штаммы вируса гриппа, которые обладают ареактогенностью и авирулентностью, но способны вызвать стойкий местный, клеточный и гуморальный иммунный ответ, обладающий защитным эффектом в отношении дрейфовых вариантов вирусов гриппа. Современные ЖГВ представляют собой препарат (Т-ЖГВ или Ч-ЖГВ), состоящий из двух штаммов вируса гриппа А и одного или двух штаммов вируса гриппа В, рекомендованных на эпидемический сезон ВОЗ [185].

На сегодняшний день ЖГВ все более и более признается в мировой практике здравоохранения. Российская ЖГВ лицензирована в России, Индии и Тайланде [151], а американская ЖГВ – в Америке, Канаде и Европе [184].

Штаммы российской ЖГВ создают путем скрещивания актуального эпидемического вируса гриппа с донором аттенуации в РКЭ, в результате чего отбираются реассортанты с формулой генома 6:2, у которых шесть «внутренних» генов должны быть от донора аттенуации, а два гена, кодирующих поверхностные белки НА и NA, - от эпидемического родителя.

Доноры аттенуации, используемые для подготовки штаммов ЖГВ в России, были созданы еще в 70-е годы и до сих пор успешно применяются. Доноры аттенуации, ранее использовавшиеся как пассажные холодадаптированные вакцинные штаммы, созданы методом пассирования эпидемических вирусов в аллантаоисной полости развивающихся куриных эмбрионах при пониженной до 25°C температуре, в результате чего эпидемические вирусы приобрели полную безвредность для человека, но сохранили способность вызывать выраженный гуморальный, секреторный и клеточный иммунный ответ. Пассирование штаммов вируса гриппа при пониженной температуре ведет к холодовой адаптации вируса, в результате которой полученные ХА варианты вируса гриппа утрачивают свойство репродукции при повышенной температуре, а вместе с этим и в нижних дыхательных путях, но активно размножаются при более низкой температуре верхних дыхательных путей. Ранее такие пассажные ХА варианты использовали в качестве вакцинных штаммов, но так как процесс холодовой адаптации продолжительный, трудоемкий и требующий многократной проверки и не может быть стандартизирован, впоследствии вакцинные штаммы стали готовить методом реассортации - скрещиванием эпидемических вирусов с полученными ранее ХА донорами аттенуации.

ЖГВ вводится с помощью распылителя в носовую полость, что обеспечивает безболезненное введение, в отличие от вакцинации инактивированными гриппозными вакцинами.

1.3.2 Инактивированные вакцины

ИГВ эффективны в предотвращении гриппозной инфекции, при условии совпадения циркулирующего и вакцинного антигенного штамма вируса гриппа.

ИГВ можно разделить на цельные, сплит-вакцины и субъединичные. При производстве цельных инактивированных вакцин, как и ЖГВ, для получения достаточного количества вируса, штаммами вируса гриппа заражаются куриные эмбрионы. Затем полученный вирус очищают, концентрируют и инактивируют с помощью формальдегида или β -пропиолактона. К таким вакцинам, разрешенным на территории Российской Федерации, относят Грипповак.

При подготовке сплит-вакцин применяются те же методы, отличие состоит лишь в том, что вирусные частицы разрушаются с помощью органических растворителей. Основными представителями сплит-вакцин являются Ультрикс, Ваксигрип, Флюарикс, Флюоваксин.

Субъединичные вакцины состоят из очищенных гликопротеидов, HA и NA, наличие которых вырабатывает достаточное количество антител для защиты от гриппозной инфекции. Также такие вакцины могут содержать адьювант: Совигрипп, Гриппол, Гриполл плюс, или быть без него: Инфлювак, Агриппал, Инфлексал V.

1.3.3 Противовирусные препараты

Противовирусные препараты позволяют снизить продолжительность заболевания в случае заражения гриппом. Они обладают избирательным действием и разрабатываются против конкретных белков-мишеней вируса.

Препараты, разработанные для борьбы с вирусом гриппа, можно разделить в соответствии с их ингибиторной активностью на: 1) блокаторы ионных каналов; 2) ингибиторы нейраминидазы; 3) общие ингибиторы репликации.

К блокаторам ионных каналов относятся производные адамантана, в частности амантадин и ремантадин. Такие препараты блокируют функцию белка ионных каналов M2 [45, 122]. Блокаторы ионных каналов целесообразны только против вируса гриппа А, так как у вируса гриппа В белок M2 заменяет VM2 и NB. Тем не менее, данные препараты эффективны в профилактике и уменьшении продолжительности заболевания гриппом А [85, 171]. Однако, к таким препаратам быстро вырабатывается резистентность. Большинство современных вирусов гриппа А являются устойчивыми к ремантадину, что обуславливается необходимостью постоянного поиска новых активных препаратов.

Еще одной группой препаратов являются ингибиторы нейраминидазы. Они влияют на ферментативную активность NA, тем самым блокируя способность вируса проникать в клетку. К таким препаратам относятся озельтамивир, тамифлю и занамивир. Ингибиторы NA хорошо зарекомендовали себя как в случае экстренной профилактики инфицирования гриппом, так и в лечении заболевания. NA участвует в процессе высвобождения зрелых вирусных частиц из инфицированной клетки, а также играет определенную роль на начальном этапе инфицирования клетки, ингибиторы NA блокируют эти процессы. Но, к сожалению, возникают штаммы вирусов, резистентные к ингибиторам NA – такие варианты возникают в случае постоянного приема препарата при длительном течении болезни, и в дальнейшем получают распространение в популяции [97].

Существуют также препараты, которые являются ингибиторами репликации, как правило, это синтетические препараты. Примером ингибиторов репликации являются рибавирин и арбидол. Рибавирин – это синтетический аналог пуринового нуклеозида, основным механизмом действия которого является возникновение летальных мутаций в геноме РНК содержащих вирусов. Для данного препарата долгое время не могли получить одобрения клинические испытания на людях, на сегодняшний день использование рибавирина в клинической практике ограничено из-за наличия у него иммунодепрессивного и тератогенного действия [188]. Наиболее удачным ингибитором репликации является арбидол, который был синтезирован в Москве более 20 лет назад и лицензирован для производства в России. Арбидол обладает специфическим действием на вирусную репродукцию, обладает способностью индуцировать интерферон [90].

1.4 Механизмы аттенуации вируса гриппа

До 60-х годов единственным методом аттенуации вируса гриппа был метод пассирования вируса в развивающихся куриных эмбрионах при оптимальной температуре [32]. Последовательные пассажи эпидемических вирусов позволяли получить аттенуированные штаммы вируса гриппа, которые обладали небольшой реактогенностью и были иммуногенными для человека. Недостатками такого метода была неопределенность в количестве пассажей, после которых наступала аттенуация вируса, что было необходимо для обеспечения безопасности вакцин для людей; это приводило к длительному пассированию. В результате многократного пассирования значительно увеличивалось время подготовки вакцинных штаммов. Кроме того, некоторые штаммы вируса утрачивали свойство иммуногенности, за счет гиператтенуации [4], а некоторые сохраняли повышенную реактогенность [5].

Другим методом аттенуации вируса гриппа стало пассирование в РКЭ при пониженной до 25–28°C температуре. В результате такого пассирования вирусы становились

холодоадаптированными и утрачивали способность к репродукции в нижних дыхательных путях, где температура выше [189]. Это ускорило получение вакцинных штаммов, однако сохранились трудности в получении ареактогенных и иммуногенных штаммов.

В современных ЖГВ, аттенуация вирусов гриппа достигается наиболее успешным методом – генетической реассортацией. При таком методе ранее полученные ХА аттенуированные штаммы устаревшей антигенной структуры (доноры аттенуации) скрещивают с «диким» вирусом гриппа при температуре 32°C в течение 48 или 72 часов (в зависимости от типа вируса гриппа), после чего вирусосодержащую аллантаоисную жидкость дважды или трижды пассируют и клонируют в присутствии антисыворотки к донору аттенуации, после чего молекулярно-биологическими методами отбирают реассортанты с поверхностными генами (НА и NA) от «дикого» вируса, а внутренними (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) - от донора аттенуации. Полученные таким образом 6:2 реассортанты становятся температурочувствительными (*ts* фенотип), как и донор аттенуации, утрачивая способность к репродукции в нижних дыхательных путях человека, и холодоустойчивыми, реплицируясь только в верхних дыхательных путях (*ca* фенотип). Данный метод стал настоящим прорывом в подготовке вакцинных штаммов.

1.4.1 Доноры аттенуации

Первыми донорами аттенуации были вирусы гриппа человека с измененным кругом хозяев (host range, *hr*-мутанты). *hr*-мутантами являются вирусы, утратившие патогенность для человека, но остававшиеся при этом патогенными для животных, например хорьков или мышей. Подготавливались такие мутанты методом длительного пассирования в различных системах (на мышках, хорьках, куриных эмбрионах и т. д.). Ярким представителем *hr*-мутантов, является вирус A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34), который стал апатогенным для человека, но остался высокопатогенным для мышей. Именно этот *hr*-мутант был первым высокорепродуктивным донором аттенуации и до сих пор используется как донор внутренних генов инактивированной реассортантной гриппозной вакцины типа А [5]. Однако, не все полученные штаммы при скрещивании донора A/PR/8/34 с эпидемическими вирусами были удачными, многие оказались реактогенными для людей [128]. В результате длительного изучения оказалось, что клоны с формулой генома 6:2 оставались вирулентными для людей, а клоны, несущие в своем составе 5 генов от A/PR/8/34 и 3 гена (NA, HA, PB1) от эпидемического родителя, были менее патогенными для человека. Таким образом, было выдвинуто предположение о наличии мутаций в определенных генах, связанных с аттенуацией вируса [128]. Те же сложности возникли при подготовке вакцинных штаммов с *hr*-мутантом A/Окуда/57, прошедшим 280 пассажей в куриных эмбрионах [71], и вирусами B/Lee/40, B/Сетаяга/3/56 и B/СССР/69 [28, 108].

Следующей попыткой в подготовке реассортантной ЖГВ было использование в качестве доноров *ts*-мутантов. Первым *ts*-мутантным донором был вирус А/Великие озера/65, который имел *ts*-мутации в генах, кодирующих белки РВ2 и NP [123]. Однако, попытки использования этого донора также оказались неудачными, поскольку подготовленная на его основе вакцина была трансмиссивна, в крови привитых отсутствовали антитела и, кроме всего прочего, вакцина оказалась реактогенной. Тем не менее, этот опыт оказался полезным, показав, что даже наличие мутаций в геноме донорского вируса не может дать полную защиту привитым людям, у которых отсутствуют антинейраминидазные и антигемагглютинирующие антитела [5].

Избежать всех недостатков, присущих первым донорам аттенуации, удалось только с началом применения ХА доноров. Холодоадаптированные доноры аттенуации, будучи в свое время вакцинными штаммами, прошли многочисленные клинические испытания [5, 30, 36, 113, 193]. Именно поэтому число доноров аттенуации очень ограничено – очевидно, что в настоящее время практически невозможно провести широкие клинические испытания нового ХА пассажного донора аттенуации. При выборе ХА донора главными критериями было наличие холодоадаптированности, температурочувствительности вирусов и множественных *hr*-мутаций, что коррелирует с аттенуацией ХА вирусов для человека [5]. Наиболее успешными отечественными ХА донорами аттенуации были следующие вирусы: А/Лен/47 прошедший 47 пассажей при 25°C; А/Лен/17, прошедший 17 пассажей при пониженной температуре; В60, пассированный 60 раз и В14, прошедший 17 пассажей при температуре 25°C. Доноры А/Лен/47и В14 были подготовлены для детской вакцины [5]. Они были более аттенуированными, чем вирусы А/Лен/17 и В60, но поскольку все доноры были ареактогенными и иммуногенными, а вакцинация разрешена у нас в стране с 3-х лет, окончательный выбор был сделан в пользу более иммуногенных доноров для детей от трех лет и взрослых: А/Лен/17и В/СССР/60/69, а доноры аттенуации А/Лен/47 и В/Ленинград/14/17/55 стали резервными.

В США готовят реассортантную ЖГВ на основе своих доноров аттенуации, в качестве доноров аттенуации используются вирусы А/Энн Арбор/6/60 и В/Энн Арбор/1/66.

Таким образом, донорами аттенуации лицензированных ЖГВ являются А/Лен/17, В/СССР/60/69 (в России) и А/Энн Арбор/6/60, В/Энн Арбор/1/66 (в США).

1.4.2 Маркеры аттенуации холодоадаптированных штаммов

Для предварительной оценки реассортантов-кандидатов в штаммы ЖГВ используются маркеры, которые показывают, приобрели ли кандидаты важные и неотъемлемые свойства вакцинных штаммов ЖГВ. Кандидаты в вакцинные штаммы должны унаследовать от донора аттенуации способность к репликации при субоптимальной температуре (холодоадаптированность, *sa*-признак), неспособность к репликации в повышенной температуре

(температурочувствительность, *ts*-признак) и признак апатогенности для восприимчивых животных (аттенуация, *att*). Приобретение указанных признаков кандидатами в вакцинные штаммы коррелирует с их аттенуацией для человека.

Маркер температурочувствительности. ХА штаммы обладают *ts* фенотипом, т.е. сниженной способностью к репродукции, вируса гриппа А при 40°C, а вируса гриппа В при 37°C. В России *ts* фенотип определяют по разности показателей инфекционного титра вируса, при оптимальной и повышенной температуре, если разница инфекционной активности вируса не менее 5,0 lg ЭИД₅₀/мл, тогда вирус считается температурочувствительным, если же менее 3,5 lg ЭИД₅₀/мл, то температуроустойчивым [5] (см. табл. 2.2).

В США для оценки степени температурочувствительности ХА вирусов используют другой подход, устанавливая показатель верхней ограничительной температуры, т.е. температуры при которой активность репродукции по сравнению с оптимальной температуры снижается в сто раз [131, 141, 142].

Температурочувствительный фенотип ХА штаммов появляется в результате пассирования вирусов в условиях низкой температуры, в результате такой селекции вируса в его геноме возникают мутационные изменения, которые называются *ts* мутациями. Сам по себе температурочувствительный фенотип не является признаком аттенуации вируса, поскольку эпидемические вирусы также могут быть неспособны к репликации при повышенной температуре. Что же касается *ts* мутаций у кандидатов в вакцинные штаммы, которые они получили от донора аттенуации, то это как раз является признаком ослабления вируса т.е. аттенуации.

Маркер холодаадаптированности. Другим важным маркером аттенуации является *sa* фенотип, поскольку холодоустойчивость вирусов обеспечивает эффективную репродукцию в ВДП. Адаптацию вирусов к пониженной температуре в России оценивают по разности показателей накопления вирусов при оптимальной и пониженной температуре. Холодаадаптированными считаются вирусы, если разница в репродукции при оптимальной (32°C) и пониженной (25°C) температуре не превышает 3,0 lg ЭИД₅₀/мл [93] (табл. 2.2).

Att маркер. Третьим маркером аттенуации ХА штаммов является их апатогенность для животных. Существует большое разнообразие восприимчивых к гриппу животных - обезьяны, хорьки, морские свинки, хомяки, мыши, хлопковые крысы (см. раздел 1.6). В зависимости от вида животного меняется и показатель вирулентности вируса, например, у хорьков ХА штаммы не способны к репликации в нижних дыхательных путях, в отличие от мышей и хомяков, у которых ХА штаммы реплицируются как в верхних так и в нижних дыхательных путях, однако намного меньше, чем эпидемический родитель. Поэтому, изучая патогенность ХА штаммов-кандидатов в

вакцинные штаммы ЖГВ на модели восприимчивых животных, необходимо в качестве контроля использовать оба родительских вируса - как эпидемический, так и донорский.

1.4.3 Роль генов в аттенуации вирусов гриппа

На сегодняшний день известно, что свойства температурочувствительности, холодоадаптированности и аттенуации для человека и животных доноров аттенуации обусловлены наличием у них мутаций, полученных при пассировании этих вирусов в РКЭ при оптимальной и пониженной температуре инкубации. Также известно, что пассирование любого вируса гриппа на той или иной модели (мышь, хорьки, эмбрионы), ведет к изменению круга хозяев вируса гриппа и утрате способности к размножению при повышенной температуре инкубации (от 37°C для вируса гриппа В и от 39°C для вируса гриппа А), что является одной из характерных черт апатогенности вируса гриппа. Поскольку неспособность вируса гриппа к репродукции при повышенной температуре ведет к утрате способности проникновения в нижние отделы дыхательного тракта человека. Это в свою очередь ведет к аттенуации такого вируса.

Для успешной борьбы с таким серьезным заболеванием как грипп, необходимо понимание роли генов и мутаций в аттенуации вируса гриппа.

Наиболее полно роль отдельных генов изучена у ХА доноров аттенуации, которые используются при подготовке штаммов коммерческой, лицензированной ЖГВ: А/Ann Arbor/6/60 (H2N2) [34, 87], В/Ann Arbor/1/66 [78], А/Лен/17 (H2N2) [94] и В/СССР/60/69 [16, 95]. Для доноров типа А описана роль в их аттенуации каждой аминокислотной замены. Так, были опубликованы работы, в которых исследователи, опираясь на уже известные данные о роли в геноме доноров аттенуации типа А уникальных мутаций, генно-инженерным путем включали эти мутации в геном «диких» вирусов, это привело их к аттенуации, подтверждая таким образом их универсальные аттенуирующие свойства. Это и работы компании MedImmune [42], и работы отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» [82], в которых в гены вируса PR8, кодирующие полимеразные белки PB2 и PB1, вносили мутации, описанные для донора А/Лен/17, и работы китайских вирусологов [74], которые фактически повторили работы [82] и [82], вставляя в гены вируса PR8 кодирующие полимеразные белки, мутации доноров А/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и А/Лен/17 (H2N2).

Для вирусов гриппа В описана роль отдельных аминокислотных замен в аттенуации донора В/Ann Arbor/1/66 [52, 78]. При изучении аттенуирующих свойств донора В60 была показана ключевая роль PB2 и PA генов в формировании температурочувствительного фенотипа [16, 95], однако аттенуацию на животной модели не изучали.

Кроме четырех приведенных выше вирусов-доноров, используемых в России и США описан ряд альтернативных доноров для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ. Для компонентов

ЖГВ типа А это A/Hong Kong/1/68/162/35 (H3N2) [34], A/Singapore/1/57ca [146], ХА вариант вируса A/PR/8/34 [14], A/X-31 (H3N2) [103], A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [68], A2/21/17 (H2N2) [2]. Для большинства этих доноров к настоящему времени роль генов в аттенуации не изучена, за исключением донора A/Краснодар/101/35/59 (H2N2), для которого было установлено влияние генов PB1 и NS на его аттенуирующие свойства [17].

Описаны также ХА варианты вирусов гриппа В - В/Виктория/2/63/87 [7], два ХА штамма на основе В/Vienna/1/99 [91], донор В/Lee/40ca [162]. Для штаммов В/Виктория/2/63/87 и В/Vienna/1/99 установлен набор аминокислотных замен, отличающих штаммы от «диких» родительских вирусов, но данных о влиянии отдельных генов на фенотип отсутствуют. Для донора В/Lee/40ca опубликованные данные, касающиеся только описания фенотипа вируса и реассортантов на его основе, без информации о конкретных генетических позициях [38]. Альтернативный донор аттенуации В/Ленинград/14/17/55 [24] охарактеризован достаточно детально с точки зрения показателей аттенуации, но нет данных о его генетической последовательности.

Таким образом, степень изученности молекулярных основ аттенуации ХА вирусов гриппа В значительно уступает, количеству информации для вирусов гриппа А. Дополнительные экспериментальные данные позволят сформировать целостную картину, позволяющую оценить вклад отдельных генов в аттенуацию вируса гриппа В.

1.5 Испытания доноров аттенуации для подготовки живой гриппозной вакцины типа В

Первым открытым вирусом гриппа В принято считать вирус В/Lee/40, выделенным в 1940 году от заболевшего ребенка [64]. Его долгое время считали эталонным, пока в 1949 году не появился вирус В/Кри/49, отличающийся от В/Lee/40 по антигенным характеристикам. Затем почти каждые 5-10 лет начали появляться вирусы, отличающиеся по своим антигенным свойствам [8]. Так, в 1955 году одним из эталонных вирусов стал вирус В/Ленинград/14/55, выделенный Ленинграде от заболевшего ребенка [35]. Затем в 1969 году в Подмоскowie был изолирован вирус В/СССР/69 [9], который сильно отличался по антигенным характеристикам от вирусов, циркулировавших ранее [8]. Данные вирусы внесли существенный вклад в инфицирование населения, что продиктовало необходимость в подготовки вакцин на их основе.

ХА штамм *В/Ленинград/14/17/55* был подготовлен в отделе вирусологии Института экспериментальной медицины путем 15 последовательных пассажей в РКЭ «дикого» вируса В/Ленинград/14/55 при 32°C и дополнительных 17 пассажей при 25°C для придания наибольших аттенуирующих свойств и использования данного штамма в качестве вакцины для детей дошкольного и младшего школьного возраста [24].

ХА штамм В14 широко использовался в для иммунизации детей с первых лет жизни, вакцинацию проводили во многих городах Советского союза с 1961 по 1983 годы, результаты данных испытаний показали эффективность и безопасность применения моновакцины и дивакцины (В14 + А/Лен/17) [1, 6, 21, 35, 132].

Первое испытание на безвредность дивакцины (В14 + А/Лен/17) проводили в период с 1961-1962 годы на группе из 2343 детей в возрасте 1-2 года из яслей и детсадов Ленинграда. Было установлено почти полное отсутствие реакций на введение дивакцины только в 1,8% случаев, были зарегистрированы легкие субфебрильные температурные реакции у детей 1 года [31]. По результатам испытаний в осенне-зимний период 1963-1964 годов на детях в возрасте 1-6 лет, было установлено отсутствие реактогенности в группе из 5803 детей, реакция на вакцину была зарегистрирована у 273 детей (4,7%), однако в контрольной группе у невакцинированных детей наблюдалась похожая картина: у 203 детей из 4233 также регистрировался подъем температуры, в результате проверки было выявлено заболевания, несвязанные с гриппом [31]. Испытания той же дивакцины в группе детей возрастом 1-6 лет, показали почти полное отсутствие реактогенности. Реакции на введение вакцины наблюдались только у 28 из 2518 детей (1,1%).

Аналогичные испытания моновакцины (В14) и дивакцины (В14 + А/Лен/17) проводились на детях младшего дошкольного и школьного возраста (от 1 года до 15 лет), по результатам которых была повторно проверена и подтверждена безопасность и эффективность применения как дивакцины, так и моновакцины. Показатели иммуногенности вакцинного штамма В14 составляли от 62,3% до 83,4% [1, 31].

Таким образом, был разработан специальный дополнительно аттенуированный вариант живой гриппозной вакцины типа В для активной иммунизации детей младшего дошкольного и школьного возраста В14, который в дальнейшем стал донором аттенуации и использовался при подготовке ХА реассортантной живой гриппозной вакцины типа В (см.ниже).

Вакцинный штамм *В/СССР/60/69* был подготовлен в отделе вирусологии Института экспериментальной медицины на основе эталонного эпидемического вируса В/СССР/69 путем пассирования в РКЭ. После 15 пассажей при 32°C, для более эффективной аттенуации вируса (холодоустойчивости) было проведено 60 пассажей при постепенно понижающейся до 25°C температуре [25].

Штамм В60 также был проверен в многочисленных клинических испытаниях на взрослых и детях дошкольного и младшего школьного возраста, однако никогда не проверялся на детях младше трех лет ввиду его меньшей аттенуированности по сравнению со штаммом В14 [1, 8].

Так, клинические испытания ХА штамма В60 проведенные на 202 детях, показали, что моновакцина на его основе была безвредной для детей с 3 до 15 лет, показатель реактогенности составлял 0,8%, а иммуногенность составила 86,1% [8].

После установления фрагментированности генома вируса гриппа и способности вируса гриппа к реассортации, наиболее успешные вакцинные штаммы начали использовать в качестве основы при подготовке штаммов живой гриппозной реассортантной вакцины. Поскольку многочисленные клинические испытания вакцинных штаммов В14 и В60 показали полную безопасность, а показатели иммуногенности были достаточно высоки, то данные штаммы стали применять в качестве доноров аттенуации. Реассортанты (кандидаты в вакцинные штаммы) подготовленные на их основе также проверялись в клинических испытаниях.

В 1989 годах были проведены масштабные клинические испытания кандидатов в вакцинные штаммы с формулой генома - 6:2, 7:1, 5:3, подготовленные на основе доноров аттенуации В14, В60 и эпидемических вирусов. Важным условием было применение актуальных по тем временам, эпидемических штаммов, циркулирующих с 1984 по 1987 годы. Такими вирусами оказались В/Техас/1/84, В/Энн Арбор/2/86, В/СССР/3/87 и В/Виктория/2/87 [1].

Изучение ХА штамма В14 подтвердило безопасность и эффективность его применения в качестве донора аттенуации для детей. Так, при изучении 7:1 реассортанта на детях 7-14 лет, подготовленного на основе вируса В/Техас/1/84, оказалось, что штамм ареактогенный, однако слабо иммуногенный (33,3%). Более высокий показатель иммуногенности (60%) был зарегистрирован при изучении кандидата в вакцинные штаммы с формулой генома 5:3 (НА, НА, NS от эпидемического вируса В/Энн Арбор/2/86), при этом реассортант оказался ареактогенным как для взрослых, так и для детей. Интересно, что при испытаниях данного 5:3 реассортанта число сероконверсий повышалось при снижении возраста привитых, так, показатель иммуногенности у детей 11-15 лет составлял 40,6%, а у детей 3-7 лет - 60%. Реассортант с формулой генома 6:2, НА и НА которого были от вируса В/Виктория/2/87, имел самый высокий показатель иммуногенности (69,2%), по сравнению с предыдущими исследованиями. Данный кандидат в вакцинные штаммы также оказался ареактогенным, а его иммуногенность составляла 68,4% у детей 7-12 лет и 69,2% у детей 3-6 лет [1].

Изучение ХА штамма В60 также подтвердило перспективность его использования в качестве донора аттенуации для детей с некоторыми оговорками. Так, при изучении 6:2 реассортанта подготовленного с использованием эпидемического вируса В/Техас/1/84 подтвердило безопасность его применения для взрослых, однако для детей 3-6 лет, реассортант обладал остаточной реактогенностью (8%). Реассортант с формулой генома 7:1, подготовленный с использованием вируса В/Энн Арбор/2/86, был испытан только на взрослых, его иммуногенность составляла 56,2%, а реактогенность - 0%. Изучение 4:4 реассортанта, унаследовавшего НА, НА, РА, М от вируса В/Энн Арбор/2/86, показало высокую иммуногенность, как для взрослых, так и для детей (57,1%), однако, показатель реактогенности

для детей 7-15 лет составлял 5,9%. Изучение же 6:2 реассортанта (НА и НА от В/Энн Арбор/2/86), показало его полную аректогенность [1].

Таким образом, при скрещивании донора аттенуации В14 с различными эпидемическими вирусами, все зависимости от их антигенной принадлежности, обеспечивало получение на основе донора В14 аттенуированных, ХА реассортантов не только для взрослых, но и для детей. Изучение использования ХА штамма В60 в качестве донора аттенуации показало, что реассортанты, полученные на его основе всегда были аректогенными для взрослых, но в отдельных случаях сохраняли остаточную реактогенность для детей. Таким образом, исследователи обосновали необходимости использования двух доноров аттенуации, донора В14 при подготовке штаммов ЖГВ для детей, а донора аттенуации В60 при подготовке штаммов для взрослых [1].

1.6 Модели животных для изучения вируса гриппа

Выбор адекватной модели животного играет важную роль в успехе экспериментов направленных на изучение вируса гриппа, так как далеко не все животные восприимчивы к гриппозной инфекции. Правильно выбранная модель поможет изучить не только механизмы передачи любой инфекции, но и найти методы борьбы с ней. Изучая безопасность и эффективность вакцин и противогриппозных препаратов для людей, необходимо использовать такую животную модель, у которой будут схожие с человеком клинические, вирусологические и гистологические показатели.

Некоторые модели животных, такие, как обезьяны, хорьки и морские свинки, восприимчивы к инфекции штаммами человеческого гриппа, для других, таких как мыши, необходима адаптация вируса. Тем не менее, из-за удобства и более низкой стоимости, гриппозную инфекцию изучают не только на обезьянах, и хорьках, но и на мышах, морских свинках, хомяках, крысах и даже аквариумных рыбках данио [46, 109]. Стремясь усовершенствовать и удешевить животную модель для изучения гриппозной инфекции, **аквариумные рыбки данио** стали привлекательной моделью. У рыбок данио, так же как и у человека, существует врожденный и приобретенный иммунитет, кроме того, с точки зрения морфологии, строение иммунных клеток (врожденного иммунитета), схоже со строением человеческих клеток. Еще одним немаловажным критерием для изучения гриппозной инфекции является выработка у рыбок данио на ранних этапах развития (4-6 недель) гликоконъюгатов с $\alpha 2,6$ связью. Такие характеристики данной модели делают рыбок данио адекватной моделью для изучения приобретенного иммунного ответа [66].

Наиболее широко используемыми животными моделями для изучения вируса гриппа являются **мыши**. Эта удобная модель с точки зрения стоимости, размеров и применения

достаточной по численности групп животных для клинических исследований. Несмотря на то, что данная модель хорошо подходит для предварительного изучения вакцины и противовирусных препаратов, у нее есть ряд существенных недостатков. Лабораторные мыши очень чувствительны к наркозу и интраназальному заражению некоторыми штаммами вируса гриппа, что иногда приводит к их быстрому и нежелательному летальному исходу. Также существенным недостатком является небольшое количество $\alpha 2,6$ рецепторов у мышей в верхних дыхательных путях и преобладание рецепторов с $\alpha 2,3$ связью [69, 81], тогда когда человеческий вирус гриппа прикрепляется преимущественно к сиаловой кислоте с $\alpha 2,6$ связью [56, 145]. Тем не менее, мыши — это хорошая недорогая модель для изучения гриппозной инфекции, у мышей проявляется почти весь спектр клинических симптомов, кроме кашля и чихания и др. Используя такую экспериментальную модель, для успешной оценки эффективности противовирусных препаратов, необходимо четко следить и учитывать следующие показатели: потеря веса животного до заражения, инфекционный титр вируса и инфекционная доза при заражении, гуморальный иммунный ответ.

Хорьки являются наиболее подходящей животной моделью для изучения гриппозной инфекции, это было подтверждено многолетними опытами, начиная с 30-х годов [166]. Хорьки, как и люди, подвержены инфекции верхних дыхательных путей, вызванной сезонными штаммами вируса гриппа, за счет наличия достаточного количества рецепторов в верхних дыхательных путях с $\alpha 2,6$ связью [86]. Также они восприимчивы к широкому спектру вирусов гриппа человека, без предварительной адаптации. Кроме того, хорьки наиболее точно имитируют заболевание вирусом гриппа человека. Такая животная модель, зараженная вирусом гриппа человека, проявляет схожие с человеком симптомы: вялость, заложенность носа, выделения из носа, чихание, потеря веса, повышение температуры [63, 166]. Наиболее подходящей эту модель для изучения противовирусных вакцин делает и то, что у иммунизированных животных развивается стойкий иммунный ответ [65]. Изучение многих современных аспектов иммунитета было бы невозможно без использования такой животной модели [41, 143]:

Изучение вируса гриппа типа А на данной модели достаточно часто встречается в литературе [63, 65, 80, 86, 112, 166], чего нельзя сказать про изучение вируса гриппа В. На сегодняшний день исследования по изучению вакцинных штаммов и эпидемических вирусов гриппа типа В на хорьках проводились только за рубежом или недостаточном количестве животных, ввиду их стоимости [80, 102, 134].

Пожалуй, главным недостатком этой модели является их высокая стоимость и условия содержания, в связи с чем, хорьки становятся недоступными для большинства рутинных исследований.

Морские свинки являются подходящей моделью для изучения инфекции, связанной с гриппом, поскольку они также предрасположены к вирусу гриппа человека. Свинки являются неприхотливыми и недорогими животными. Несмотря на их предрасположенность к гриппозной инфекции, в частности к сезонному гриппу, у такой модели есть недостатки, главным из которых является отсутствие важных клинических признаков заболевания, проявляемых зараженными животными. Главными проявлениями клинических симптомов инфицированных морских свинок является вялость, потеря веса, повышение температуры, в некоторых случаях наблюдается пневмония [173, 179]. У этой животной модели, как и у хорьков, вирус наиболее активно реплицируется в дыхательных путях [110, 170].

Преимуществом модели *хлопковых крыс* является использование вирусов гриппа человека без предварительной адаптации, что делает хлопковых крыс неплохой моделью для изучения гриппозной инфекции. Также крысы являются более доступной моделью, в отличие от хорьков. После инфицирования некоторыми штаммами вируса гриппа у таких крыс можно наблюдать потерю веса, увеличение частоты дыхания, также, в зависимости от штамма, наличие вируса можно наблюдать как в верхних, так и в нижних дыхательных путях [60, 139].

Еще в 40-х годах для изучения механизмов гриппозной инфекции использовали *хомяков* [174], в результате чего было показано, что хомяки, зараженные вирусом гриппа человека (т. е. без предварительной адаптации к виду), проявляют клинические симптомы, а также могут вырабатывать антитела на введенный патоген. Несмотря на то, что хомяки являются неприхотливой моделью, сейчас ее используют реже. У зараженных вирусом гриппа хомяков, как у людей, морских свинок и хорьков, вирус чаще всего обнаруживается в верхних дыхательных путях. Кроме того, у этой модели, как и у людей, оптимальная температура тела составляет 37°C, в результате чего ранее хомяков активно использовали для изучения живых аттенуированных гриппозных вакцин, поскольку аттенуированные вакцины не способны к репликации при повышенной температуре, а значит и в нижних дыхательных путях хомяков [124].

Люди являются физиологически и генетически более схожими с обезьянами, чем с другими видами млекопитающих, поэтому *обезьяны* являются наилучшей моделью для изучения патогенов человека. В исследованиях, использовавших обезьян (макак) в качестве модельных животных, было показано, что они являются адекватной моделью для изучения противовирусных препаратов и противогриппозных вакцин [40, 54, 83, 101, 144]. Однако, немногие лаборатории могут использовать обезьян в качестве экспериментальных животных, в первую очередь, из-за этических соображений, из-за их высокой стоимости и сложности размножения в неволе.

Из вышесказанного следует, что среди экспериментальных моделей животных для изучения вируса гриппа есть широкий выбор, но у каждой модели имеются свои достоинства и недостатки, поэтому, выбирая животную модель, необходимо главным образом учитывать цели эксперимента;

одни экспериментальные модели подходят для изучения патогенеза, другие, например, - для трансмиссивности.

1.6.1 Модели для изучения патогенеза гриппозной инфекции

Изучая патогенез гриппозной инфекции, необходимо главным образом учитывать, как протекает заболевание, с какими симптомами и к чему может привести, в результате чего можно понять, какие механизмы связаны с таким тяжелым заболеванием, как грипп. Выбирая же животную модель для изучения патогенеза гриппозной инфекции необходимо главным образом учитывать проявления клинических симптомов.

Как правило, описывая клиническую картину инфекции, связанной с вирусом гриппа и эффективности вакцинации, учитывают такие параметры как изменение массы тела, повышение или понижение температуры, активность животного, выделение из носа, заложенность носа, чихание, активность, аппетит, взъерошенность шерсти.

Мыши являются хорошим объектом для изучения патогенеза гриппозной инфекции. С правильно подобранными условиями, можно увидеть следующую клиническую картину: взъерошенность шерсти, вялость, отсутствие аппетита, потеря веса, также у некоторых животных наблюдается воспалительный процесс в легких и даже пневмония [59, 67, 100]. Многие вирусы, подтипов H5 и H7 распространяются за пределы дыхательной системы мышей, поражая мозг, селезенку, почки и сердце [44, 111, 114].

Клиническая картина у хорьков схожа с симптомами, возникающими в организме человека зараженным вирусом гриппа, что делает эту модель подходящей для изучения патогенеза гриппозной инфекции [176]. Выбирая хорьков для оценки патогенеза, можно в отличие от мышей, использовать вирусы без их предварительной адаптации.

Обезьяны, хомяки и хлопковые крысы, также хорошие модельные животные для оценки патогенеза. Выбирая эти модели, как и в случае с хорьками, предварительной адаптации вируса не требуется. Клинические симптомы проявляются у всех этих животных, конечно, стоит выделить обезьян, как наиболее адекватную модель, но с этической и экономической точки зрения, использование хомяков и хлопковых крыс также хорошо подходит для изучения патогенеза.

Исключение составляют лишь морские свинки, поскольку зараженные животные не проявляют признаков заболевания, что делает эту модель не подходящей для оценки патогенеза гриппозной инфекции.

1.6.2 Модели для изучения трансмиссивности вируса гриппа

Зная механизмы и пути передачи вируса гриппа, можно предотвратить или препятствовать распространению пандемических и эпидемических штаммов, поэтому выбор животной модели для изучения трансмиссивности вируса гриппа имеет важное значение.

Животные, используемые для оценки трансмиссивности, должны быть естественно восприимчивы к гриппозной инфекции, поэтому мыши являются неподходящей моделью, хотя в 30-х годах эту экспериментальную модель пытались использовать для изучения трансмиссивности и даже получали определенные результаты [155–161]. Позднее попытки других авторов повторить удачные эксперименты Shulman et al [155–161] на мышах, не увенчались успехом [110].

Можно было предположить, что все остальные модели животных, пригодные для изучения гриппозной инфекции, такие, как хорьки, морские свинки, хомяки и хлопковые крысы, которые естественно восприимчивы к инфекции вируса гриппа, подойдут для изучения трансмиссивности, однако это не так. Несмотря на то, что обезьяны физиологически и иммунологически близки к людям, они не могут передавать между собой вирус гриппа без предварительной его адаптации [109]. А такие животные, как хорьки, морские свинки и хомяки активно передают между собой вирус гриппа человека [46], что делает этих животных подходящей моделью для изучения трансмиссивности вируса гриппа.

1.7 Заключение

Высокая антигенная изменчивость является угрозой появления новых высокопатогенных вирусов гриппа, что свидетельствует о важности их изучения и совершенствования способов борьбы с ними. В настоящее время наиболее широко изучаются вирусы гриппа типа А и способы борьбы с инфекцией вызванной ими, чего нельзя сказать о вирусах гриппа В. Однако, эволюция вирусов гриппа В принадлежащих двум различным генетическим линиям и усиление тяжести заболеваний, вызванных современными вирусами гриппа типа В, особенно у маленьких детей, подчеркивает важность эпиднадзора и разработки оптимальных вакцинных штаммов против этого типа вируса гриппа.

ЖГВ, как способ борьбы с вирусом гриппа, хорошо зарекомендовали себя. Что касается доноров аттенуации для подготовки ЖГВ, то и тут наиболее полно изучены доноры аттенуации типа А, особенно это касается доноров аттенуации для подготовки штаммов ЖГВ для маленьких детей. На сегодняшний день по изучению роли генов в аттенуации вируса гриппа В всего несколько работ, как в России, так и за рубежом, что же касается вирусов гриппа А, вне сомнения, полностью доказаны механизмы их аттенуации. Для защиты от гриппа такой уязвимой категории

населения как маленькие дети, необходимы доноры аттенуации с повышенными характеристиками безопасности, наиболее перспективным кандидатом для этой роли является донор В/Ленинград/14/17/55.

Все выше сказанное свидетельствует о необходимости углубленного изучения вирусов гриппа В, как с точки зрения фундаментальной науки, так и в плане практического применения для разработки донора аттенуации реассортантной вакцины для самой незащищенной возрастной группы – детей в возрасте до трех лет. Это и послужило содержанием нашей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Вирусологические методы

Вирусы. В работе были использованы вирусы гриппа типа В (табл.2.1).

Таблица 2.1. Список используемых в работе вирусов

№	Вирусы	Источник получения
Холодоадаптированные вирусы (доноры аттенуации и вакцинные штаммы ЖГВ)		
1	В/Ленинград/14/17/55 [24]	ИЭМ ¹
2	В/СССР/60/69 [25]	ИЭМ
3	В/14/28Р [27]	ИЭМ
4	В/60/32Р [26]	ИЭМ
5	В/60/Phuket/2013/26 [23]	ИЭМ
6	В/14/Phuket/2017/74 Крутикова Е.В.	ИЭМ
7	В/60/Brisbane/08/83 [22]	CDC ²
8	В/14/Brisbane/2017/54 Крутикова Е.В.	ИЭМ
Эпидемические вирусы		
9	В/Phuket/3073/2013	CDC
10	В/Brisbane/60/08	CDC
11	В/Indiana/25/2015	CDC
12	В/Massachussets/2/12	CDC

Обозначения: ¹ ИЭМ – ФГБНУ «ИЭМ», музей вирусов отдела вирусологии им А.А.Сморозинцева; ² CDC – Центр по контролю за заболеваемостью, Атланта, Джорджия, США

ХА доноры аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины, а также реассортантные вакцинные штаммы, полученные на их основе, являются собственностью ФГБНУ «ИЭМ». Живые гриппозные вакцины, использованные в экспериментах на хорьках, были подготовлены Serum Institute of India (Pune, India). В их состав входили штаммы, подготовленные на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 и следующих эпидемических вирусов: А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09, А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) и В/Brisbane/60/08 (В/Vic).

Культивирование вирусов проводили на 10-11 дневных РКЭ полученных из ООО "Племрепродуктор Назия" (Ленинградская область, пос. Приладожский) заражая 10-кратными разведениями вируса (по 0,2 мл) и инкубируя при 32°C в течение 72 часов. Затем, предварительно охладив эмбрионы в течение 2-4х часов при температуре +4°C, вирусодержащую аллантоисную жидкость собирали и хранили при температуре -70°C.

Инфекционную активность вирусов оценивали по методу Рида и Менча [141] и выражали в 50%-ой эмбриональной инфицирующей дозе (ЭИД₅₀). Для такой оценки использовались также 10-11 дневные куриные эмбрионы. Вирусодержащую жидкость

вводили в 10-кратных разведениях по 3-5 РКЭ на одно разведение. После 72 часовой инкубации при 32°C в РКЭ, определяли наличие вируса в аллантоисной жидкости по стандартной методике гемагглютинации (РГА) [19] с 1% эритроцитами кур.

Ts и ca фенотип вируса гриппа оценивали по разнице инфекционной активности вируса при оптимальной (32°C); повышенной (37°C) и пониженной (26°C) температуре. Температурочувствительными (*ts*) считали вирусы, у которых разница составляла не менее 5,0-5,5 lg ЭИД₅₀/мл и температуроустойчивыми (*non-ts*), если разница была не выше 3,0 lg ЭИД₅₀/мл. Холодоустойчивыми (*ca*) считали те вирусы, у которых разница при оптимальной и пониженной температуре составила не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл и чувствительными к пониженной температуре (*non-ca*) если этот показатель составлял не менее 5,0 lg ЭИД₅₀/мл [93] (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Параметры оценки температурочувствительности (*ts*-фенотип) и холодоадаптированности (*ca*-фенотип) вирусов гриппа в опытах на РКЭ

RCT26 (<i>ca</i> -фенотип)		RCT40(37) (<i>ts</i> -фенотип)	
1,5–3,5 lg ЭИД ₅₀	<i>ca</i>	5–8 lg ЭИД ₅₀	<i>ts</i>
3,5–5,0 lg ЭИД ₅₀	±	3,5–5 lg ЭИД ₅₀	±
5,0–8,0 lg ЭИД ₅₀	<i>non-ca</i>	1,5–3,5 lg ЭИД ₅₀	<i>non-ts</i>

Подготовку реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ осуществляли путем скрещивания родительских вирусов (донора аттенуации и эпидемического вируса) при температуре 32°C, затем вирусы пассировали как при пониженной температуре в присутствии крысиной антисыворотки к донору аттенуации (для получения реассортантов с формулой генома 6:2) так и при оптимальной температуре (для получения реассортанта с разнообразной формулой генома). После двух селективных пассажей при пониженной и оптимальной температуре проводили 2-3 клонирования методом предельных разведений [5]. У выбранных клонов после 1-3 клонирования определяли состав генома.

2.2 Методы работы с лабораторными животными

Животные. Работа с животными производилась в соответствии с «Правилами лабораторной практике» [29]. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51) и с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по

охране животных, используемых в научных целях [13]. Работа с животными была одобрена локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ».

В работе были использованы: мыши линии СВА, беспородные мыши, полученные из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленобласть, Всевожский район, Рапполово). Также в работе были использованы самки и самцы хорьков, возрастом 5-6 месяцев, работы с хорьками проводили в сотрудничестве с ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, тер. Кузьмолловский).

Мышей и хорьков содержали в стандартных клетках при температуре 18-22°C. У хорьков был гамак для сна и хлопок - как материал для гнездования. Влажность в помещении вивария составляла 25%, регистрацию осуществляли с помощью беспроводной погодной станции Oregon Scientific, модель VAR388HG (Китай). Все использованные в работе животные имели свободный доступ к воде и пище. Всего в работе было использовано 500 мышей и 48 хорьков.

Оценку репликации вирусов в нижних дыхательных путях мышей оценивали по стандартной методике [20]. Мышей делили на группы (5-10 штук) и заражали (по 50мкл на мышь) анализируемыми вирусами в инфекционном титре 6 lg ЭИД₅₀/мл. Заражение производилось под легким эфирным наркозом. Затем через 1,3,5 и 7 суток после начала эксперимента животных подвергали эвтаназии. Для определения титра вируса в легких мышей, легкие гомогенизировали в стерильной ступке, используя стерильный песок в качестве абразивного материала, готовили 10% суспензию на физиологическом растворе и центрифугировали при 3000 об/мин. Затем надосадочной жидкостью заражали РКЭ 10-кратными разведениями суспензии на физиологическом растворе.

Оценку иммуногенности и протективности на мышах проводили по стандартной методике [20]. Мышей делили на группы (5-10 штук) и однократно иммунизировали с (по 50мкл на мышь) под легким эфирным наркозом, анализируемыми вирусами в инфекционном титре 6 lg ЭИД₅₀/мл. Через 3 недели после последней иммунизации у мышей производили забор крови и оценивали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) уровень вирус-специфических антител. Гомогенезаты из органов мышей подготавливали методом описанном выше.

Оценку иммуногенности и перекрестной протективности вакцинных штаммов на хорьках устанавливали по уровню репродукции вируса в носовых ходах и легких. Хорьков делили на 7-9 групп, по 3-е животных в каждой группе, группы животных были сформированы рандомизировано (случайным образом с использованием генератора случайных чисел программы Statistica 6.0 StatSoft, США) после серологического исследования крови на содержание антител к анализируемым вирусам. В группы были

отобраны только серонегативные животные. Каждая группа хорьков находилось отдельно в специализированной комнате.

Вакцинацию проводили интраназально в дозе $8 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, в объеме 0,5 мл в каждый носовой ход. На 3 сутки после начала эксперимента у всех животных собирали носовые смывы (в 1,0 мл стерильного физиологического раствора), которые затем использовали для обнаружения титра вируса в РКЭ. На 21 (в эксперименте по мовалентным ЖГВ) и 27 (в эксперименте по трехвалентным ЖГВ) день после начала эксперимента у всех животных производился забор крови в объеме 2,0 мл для определения гуморального иммунного ответа и производили заражение животных в дозе $6 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, в объеме 0,5 мл в каждый носовой ход. Затем на 28 (М-ЖГВ) и 31 (Т-ЖГВ и К-ЖГВ) день эксперимента производили забор смывов и легких у всех животных. Для обнаружения титра вируса носовые смывы титровали 10-кратными разведениями в РКЭ, легкие гомогенизировали в стерильной ступке и готовили 10% суспензию, которую также титровали в РКЭ.

2.3. Серологические методы

Гуморальный иммунный ответ хорьков определяли в стандартной реакции торможения гемагглютинации, регламентированной для испытания антигенной активности гриппозных вакцин с использованием 4 АЕ антигена и 1,0% взвеси эритроцитов кур. Через 3-4 недели после заражения у животных производился забор крови. Для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации проводилась обработка сыворотки препаратом RDE (receptor–destroying enzyme производства Denka–Seiken, Tokyo, Japan) согласно протоколу производителя.

Получение иммунных сывороток. Для иммунизации использовали белых беспородных крыс, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН. Крыс иммунизировали внутрибрюшинно по 5 мл вирусосодержащего материала в течение двух недель (5 иммунизаций) с интервалом 3-4 дня, 4-5 иммунизация проводилась подкожным введением вируса с адьювантом в холку животного в дозе 1мл. Через неделю после последней иммунизации производили забор крови из подключичной вены животного.

2.4. Молекулярно–биологические методы

Выделение РНК производили из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, суспензии легких и носовых смывов, полученных от хорьков. Выделение осуществляли с помощью набора «РИБО-преп» (Ампли Прайм, Россия) или QIAamp Viral RNA Minikit (Qiagen GmbH, Германия) в соответствии с протоколами производителей.

Получение кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) в соответствии с протоколом производителя.

Получение ПЦР продуктов осуществляли с помощью набора DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) в соответствии с протоколом производителя. Условия постановки реакции: денатурация в течение 3 минут при 95-98°C, 40 циклов, включающих 30-секундную денатурацию при 95-98°C, 30-секундный отжиг праймеров при 55-60°C, элонгацию при 72 °C в течение 1-2 минут; после выполнения циклов 10-15 минут на полимеризацию недосинтезированных фрагментов при 72°C, после чего охлаждение и хранение при 4°C. Детекция фрагментов производилась методом электрофореза в 1,0 % агарозном геле.

Для этапов ОТ-ПЦР и секвенирования были использованы специфические праймеры к консервативным участкам последовательности вирусов гриппа (табл. 2.3). Праймеры подбирались в соответствии с требованиями протокола генетического анализа с помощью PyroMark Q24.

Пиросеквенирование. Подготовка к реакции пиросеквенирования и постановка анализа производилась с использованием системы генетического анализа PyroMarkQ24 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя.

На этапе подготовки к реакции пиросеквенирования производили разделение цепей ДНК. ПЦР-продукт, полученный в результате реакции амплификации с использованием праймеров, один из которых биотинилирован по 5'-концу, инкубировали с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare), после чего помещали в буфер для денатурации ДНК. После промывания частицы сефарозы с осажденными на них одноцепочечными фрагментами ДНК помещали в буфер, содержащий специфические праймеры этапа секвенирования, и производили отжиг праймеров. Далее пробы помещали для анализа в пиросеквенатор PyroMark Q24 для секвенирования коротких участков ДНК путем синтеза второй цепи на матрице однонитевой ДНК. Последовательность внесения нуклеотидов в реакционную смесь подбирали таким образом, чтобы каждому подтипу вируса гриппа соответствовали отдельные «диагностические» пики на пирограмме, что дает возможность определения примеси вируса данного подтипа в составе смеси (табл. 2.3).

Таблица 2.3 Расположение участков отжига праймеров этапов ПЦР и пиросеквенирования, подобранных к консервативным участкам последовательности вирусов гриппа В

Сегмент генома	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер фрагмента, п.н.	Праймер этапа секвенирования
PB2	AATCCACAAACAGAAGTCСТААС	Biotin- TTCTTTGTCTYTТААТТССТТGTG	296	AGATCAATGGGGAATG
PB1	TACAGGCRGCAATTTCAACAA	Biotin- TGTTCTCATCCATTCTATCCA	255	ACAATAGACACCGTGAT
PA	TGTAGARTGGCTGCTTGGGTT	Biotin-CCTTTAACCGCCAGACCRТА	298	CTACMGTTATGATGAAGTAT
NP	ATTGGCTGCYACTGATGACAAGA	Biotin- CTTCYTTCCCTTCTTTGACATCTC	76	GCYACTGATGACAAGAAAAC
M	CATGTACCTGAAYCCTGGAAAYT	Biotin-TCTGCATTTTCYCGYCTCACT	145	AAACAAGCATCACATTC
NS	GAAAAGCAATTGGRGTAAAAATG	Biotin- TTTGTTGTTGATGTCCCTYAATAC	229	GATGACATAGARGAAGAACC

Секвенирование последовательности сегментов генома осуществляли при использовании автоматического капиллярного секвенатора 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems) в соответствии с инструкцией производителя. Последующая обработка данных производилась с использованием пакета программ Lasergene 7.1 (DNASTAR).

2.5 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка производилась по стандартным методикам [4, 43-44], с использованием программного обеспечения Statistics 6.0 и GraphPad Prism 5.0. Проверка на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка, оценка равенства дисперсий производилась с помощью критерия Левена. При нормальном распределении выборок применялись параметрические методы статистического анализа: для сравнения средних значений в двух группах чисел использовался t-критерий Стьюдента, были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, также использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и при большем количестве групп, достоверность влияния группирующих факторов определялась с использованием дисперсионного анализ Фишера. Когда данные не подчинялись закону нормального распределения, применяли непараметрические методы. В таких случаях сравнение средних значений в группах производилось с использованием критерия Манна-Уитни (в случае независимых выборок), либо коэффициента Вилкоксона (в случае зависимых измерений). Определение значимости влияния группирующего фактора в случае, если количество выборок превышало две, проводилось с использованием теста Крускала-Уоллеса. Отличия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ДОНОР АТТЕНУАЦИИ В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ РЕАССОРТАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОДНОГО ГОДА И СТАРШЕ

Защита от гриппа детей раннего возраста является одной из важнейших задач здравоохранения. В музее отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» хранится ХА штамм В/Ленинград/14/17/55. Данный штамм может стать перспективным донором при подготовке штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте от года до трех лет [1, 9]. Штамм В14 обладает всеми фенотипическими свойствами, присущими донорам аттенуации (*ts/ca/att* фенотип). В 1960–1970 гг. В14 был широко апробирован в клинических наблюдениях в качестве вакцинного штамма, а в 1980–1990 гг. – как донор аттенуации. После многочисленных клинических наблюдений на детях в возрасте от одного года и старше, В14 зарекомендовал себя как штамм, обладающий повышенными характеристиками безопасности и иммуногенностью для детей младшего дошкольного и школьного возраста [1, 6, 9, 18, 35, 133].

После 1991 года в качестве базового донора аттенуации ЖГВ был выбран ХА вирус В/СССР/60/69, а ХА вирус В/Ленинград/14/17/55 остался в качестве резервного; его исследования были приостановлены, в связи с чем, отсутствуют данные о геноме вируса и молекулярных основах его аттенуации. Поскольку данная информация на сегодняшний день является основополагающей для использования нового донорского вируса при подготовке живой гриппозной вакцины, в представленной работе резервный штамм В14 был полностью охарактеризован самыми современными методами.

Прежде всего, была определена нуклеотидная последовательность резервного донора В14. Была выявлена гетерогенность его популяции по ряду позиций, что потребовало его клонирования для получения чистых линий. Ранее (в 1960–1970 гг.) вирус В14 этой процедуре не подвергался. В нашем распоряжении имелся вакцинный штамм В/14/28, подготовленный в 1980–х гг. на основе эпидемического вируса В/СССР/3/87 и донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55. Поскольку теоретически при скрещивании донора с «диким» вирусом в геном реассортанта мог перейти любой из клонов гетерогенной популяции донора, важно было отобрать клон донора В14, по фенотипическим характеристикам и нуклеотидному составу максимально соответствующий вакцинному штамму В/14/28, в прошлом зарекомендовавшему себя как безвредный и высокоиммуногенный для детей [21].

3. 1 Клонирование донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и отбор перспективных клонов

Было проведено двойное клонирование вируса В14 методом предельных разведений на SPF (свободных от специфической патогенной флоры) РКЭ, в результате чего отобрали 8 клонов. Температурочувствительность полученных клонов определяли по двум точкам за верхним пределом температурного оптимума (37 и 38°C), опираясь на полученный ранее опыт [16] работы с официально разрешенным к использованию базовым донором аттенуации В60. Проведенный фенотипический анализ показал, что отобранные клоны, как и сам донор В14, обладая выраженным *ca* фенотипом, проявляют определенную вариабельность при культивировании за верхними пределами температурного оптимума (37 и 38°C), позволившую разделить их на 3 группы: (1) температуроустойчивые при 37°C, но температурочувствительные при 38°C; (2) клоны с «пограничной» (не четко выраженной) температурой инкубации; (3) температурочувствительные как при 37°C, так и при 38°C. В качестве контролей были использованы базовый донор аттенуации В60, *ts* при 38°C, но *non-ts* при 37°C и вакцинный штамм В/14/28, который оказался высокотемпературочувствительным при обеих использованных температурах (табл.3.1).

Таблица 3.1 Фенотипические характеристики доноров аттенуации и клонов подготовленных основе резервного донора В/Ленинград/14/17/55

Вирусы, клоны		RCT при t °C			Фенотип при t °C		
		37 °C	38 °C	26 °C	37 °C	38 °C	26 °C
Базовый донор В60 ¹		1,5±0,4	8,0±0,2	2,0±0,1	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Резервный донор В14		4,0±2,0	6,8±1,2	1,7±0,5	<i>ts/± ts</i>	<i>ts/± ts</i>	<i>ca</i>
Вакцинный штамм В/14/28		6,3±0,7	7,6±0,9	2,1±0,3	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/740	Группа 1	3,0±1,2	4,8±1,9	5,3±1,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/830		3,3±1,9	6,8±0,4	3,5±0,8	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/780	Группа 2	4,0±0,9	6,8±0,5	2,2±0,5	$\pm ts$	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/690		3,9±1,5	3,6±1,9	3,1±0,5	$\pm ts$	$\pm ts$	<i>ca</i>
В14/680		4,9±0,3	5,4±1,5	2,6±0,9	$\pm ts$	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/611	Группа 3	6,3±1,8	5,3±0,9	3,0±0,3	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/710		6,2±0,2	7,8±0,1	1,9±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/610		6,5±0,5	6,8±0,2	1,8±0,1	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>

Обозначения: ¹Клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69 (525) [16]

Известно, что температурочувствительный фенотип вирусов гриппа четко коррелирует с его аттенуацией [95]. Поскольку нашей задачей было выделение из популяции ХА вируса В14 наиболее аттенуированного клона, который к тому же должен опережать по этому показателю базовый донор В60, пристальное внимание было уделено группе 3, наиболее температурочувствительной и соответствующей по этому признаку штамму сравнения В/14/28. Мы провели полногеномное секвенирование всех температурочувствительных клонов этой

группы (B14/611; B14/710; B14/610) и вакцинного штамма B/14/28. Для дальнейшей работы был выбран клон B14/710, не содержащий гетерогенных позиций (рис.3.1), наиболее чувствительный к температурам инкубации 37°C и 38°C и соответствующий по нуклеотидным последовательностям внутренних генов вакцинному штамму B/14/28.

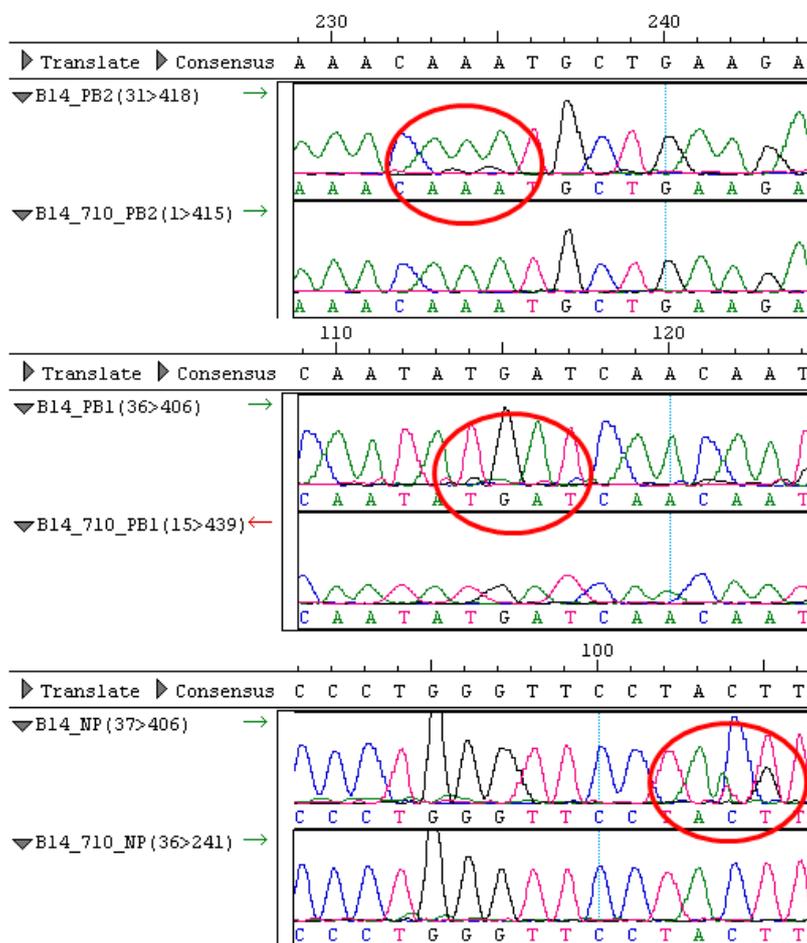


Рисунок 3.1 Хроматограмма участков генов PB2, PB1 и NP неклонированного донора В/Ленинград/14/17/55 и его клона B14/710

3.2 Выявление аттенуирующих мутаций в последовательности альтернативного донора аттенуации B14/710

Поскольку «дикий» предшественник резервного донора не сохранился, для определения кодирующих замен, которые могут отвечать за аттенуацию вируса B14/710, было выполнено сравнение последовательностей белков донора B14/710 и вакцинного штамма B/14/28 с последовательностями «диких» вирусов гриппа В разных лет выделения путем множественного выравнивания. Использовались от 200 до 700 аминокислотных последовательностей белков вирусов гриппа типа В, имеющихся в базе данных Influenza Research Database (www.fludb.org).

Генетический анализ альтернативного донора B14/710 и вакцинного штамма B/14/28 выявил 17 аминокислотных замен в консервативных участках белков вирусов (табл.3.2). Количество уникальных мутаций в геноме B14/710 оказалось выше, чем у ранее исследованных

доноров аттенуации. Расположение замен в белках В14/710 отличается от замен, характерных для использующихся на настоящий момент доноров аттенуации В60 и В/АА. Исключение составляет лишь одна общая замена в 377 аминокислотной позиции NP гена альтернативного донора В14/710 и донора В60, которая встречается только у двух этих штаммов.

Таблица 3.2 Нуклеотидные и аминокислотные замены альтернативного донора аттенуации В14/710

Сегмент генома	А/к позиция	В/14/28 ²	В14/710	WT вирусы	А/к замена обнаружена у WT вирусов	Уникальность замены
PB2	20	Pro	Pro	Thr	0/592	Да
	62	Ile	Ile	Thr	2/592	Да
	124	Arg	Arg	Lys	0/592	Да
	158	Gln	Gln	Pro	2/592	Да
	303	Met	Met	Ile	1/592	Да
	467	Gly	Gly	Glu	1/592	Да
PB1	75	Lys	Lys	Glu	0/596	Да
	737	Gly	Gly	Asp	2/596	Да
PA	191	Arg	Arg	Ile	0/730	Да
	236	Arg	Arg	Lys	7/730	Да
	538	Ile	Ile	Val	1/730	Да
	614	Ala	Ala	Thr	1/730	Да
	673	Asn	Asn	Gly/Ser	0/730	Да
NP	145	Val	Val	Ile	1/610	Да
	242	Gly	Gly	Val	0/610	Да
	377	Asn	Asn	Asp	1/610	Да
	631	Ile	Ile	Thr	3/610	Да
M1 ¹	–	–	–	–	271/271	Нет замен
BM2	21	Val	Val	Met	10/454	Нет
	87	Val	Val	Ile	10/454	Нет
NS1 ¹	–	–	–	–	753/753	Нет замен
NS2 ¹	–	–	–	–	220/220	Нет замен
ВСЕГО уникальных кодирующих замен:						17

Обозначения: ¹Анализ аминокислотных последовательностей NS и M сегментов не выявил различий между клоном В14/710 и эпидемическими вирусами гриппа В, представленными в базе данных Influenza Research Database. ²Вакцинный штамм В/14/28 использован в качестве вируса сравнения.

Так как именно уникальные аминокислотные замены, появившиеся в результате холодовой адаптации вирусов, придают им аттенуирующие свойства, было важно провести сравнительный анализ биологических признаков двух доноров: альтернативного донора В14/710, содержащего 17 уникальных аминокислотных замен, и используемого в практике здравоохранения донора В60, содержащего 7 уникальных замен.

3.3 Сравнительная характеристика доноров В14/710 и В/СССР/60/69

Мы провели анализ ростовых характеристик и репродукции в нижних дыхательных путях мышей штамма В14/710 в сравнении с донором В60 (таблица. 3.3).

Таблица 3.3 Биологические свойства доноров аттенуации В14/710, В60

Вирусы	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /мл						
	РКЭ			Легкие мышей			
	32°C	37°C	26°C	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
В60	9,7	3,2	6,6	3,3±0,56	3,1±0,7	1,8±0,77	0,7
В14/710	8,5	2,2*	6,6	2,2±0,53	2,5±0,21	1,5±0,86	0,7

Обозначения: * Критерий Манна-Уитни $U=0$, $Z=1,99$, $p=0,046$.

Оказалось, что у альтернативного донора статистически достоверно ($p=0,046$) ниже титр вируса, при повышенной температуре инкубации, что говорит о его большей температурочувствительности по сравнению с донором В60. Кроме того, репродукция в легких мышей также была ниже, что особенно четко проявлялось на первые и пятые сутки эксперимента.

3.4 Иммуногенность реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на вирусе В/14/710, в эксперименте на мышах

В конце 1980–х гг. были проведены сравнительные наблюдения на детях безвредности и иммуногенности двух реассортантов, В/60/32 и В/14/28, подготовленных соответственно на основе доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В/Ленинград/14/17/55. В качестве эпидемического родительского вируса был использован вирус В/СССР/3/87. Оба вакцинных штамма оказались ареактогенными для детей в возрасте 3–14 лет. Двукратная вакцинация серонегативных детей вызывала подъем титров антигемагглютинирующих антител в 4 и более раз у 63,9% (В/60/32) и 62,0% (В/14/28) привитых [21]. Таким образом, по показателям безвредности и иммуногенности оба донора не уступали друг другу. Эти результаты послужили толчком для проведения заключительной части первого направления наших экспериментальных исследований, посвященной сравнительному изучению иммуногенности реассортантов, подготовленных параллельно на основе двух доноров аттенуации – базового и резервного.

Из данных литературы известно, что зачастую с повышением аттенуирующих свойств вакцинных штаммов страдала их иммуногенность – безвредные для человека гриппозные вакцины оказывались слабо иммуногенными [5]. Поэтому важно было продемонстрировать выраженную иммуногенность вакцинных штаммов, подготовленных на основе более аттенуированного, чем базовый донор В60, вируса. Для сравнения использовали три пары вакцинных штаммов – вирусы В/60/32 и В/14/28, одинаковая иммуногенность которых уже была успешно продемонстрирована в наблюдениях на детях, и вакцинные штаммы, подготовленные на основе современных эпидемических вирусов В/Phuket/3073/2013 (линия Ямагата) и В/Brisbane/60/08 (линия Виктория) и обоих донорских штаммов.

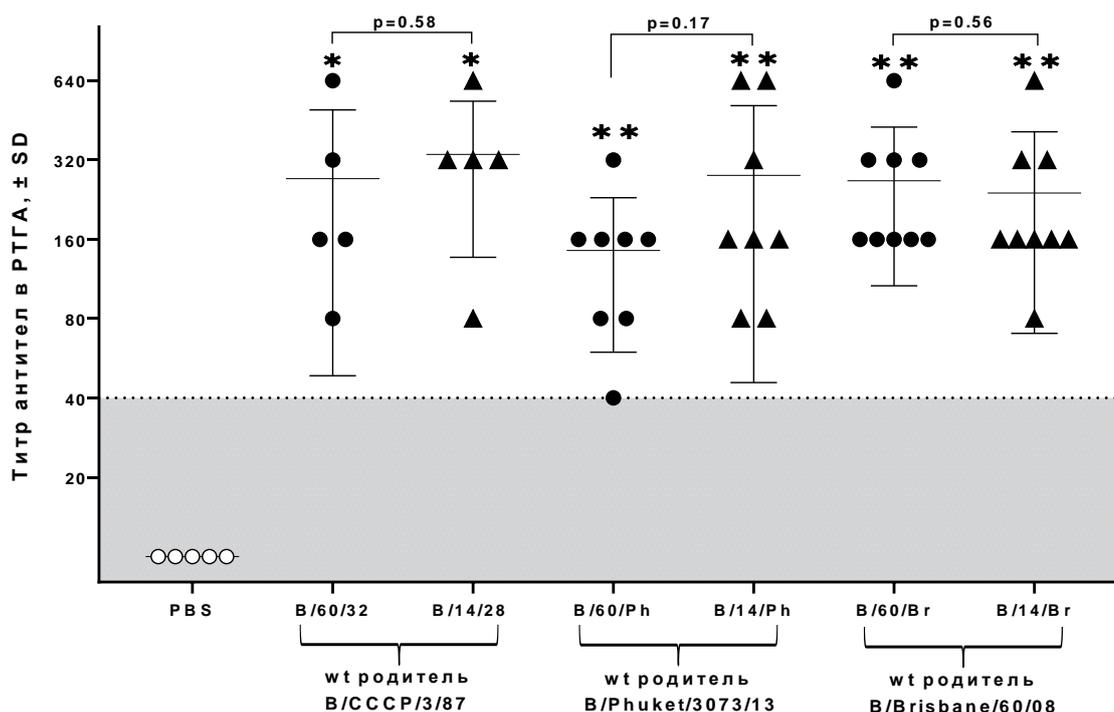


Рисунок 3.2 Иммуногенность вакцинных штаммов, подготовленных на основе доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В/14/710, на модели мышей линии СВА. Обозначения: черные кружки – штаммы, подготовленные на основе донора В60; черные треугольники – штаммы, подготовленные на основе донора В14; минимальный титр антител, рассматриваемый как сероконверсия (1:40), выделен серым цветом и обозначен пунктирной линией; статистически значимое снижение титра антител по отношению к группе неиммунизированных животных, получивших PBS, обозначено как *($p < 0,02$) и **($p < 0,0001$); вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора В/СССР/60/69: В/60/32, В/60/Ph, В/60/Br; вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора В/14/710: В/14/28, В/14/Phuket/2017/74 (В/14/Ph), В/14/Brisbane/2017/54 (В/14/Br).

Однократная интраназальная иммунизация мышей линии СВА в дозе 6,0 Ig ЭИД₅₀/мл приводила к выраженному гуморальному ответу на вакцинацию через 3 недели от начала опыта. Значение среднегеометрических титров находилось в интервале 1:160–1:320 (рис. 3.2). При этом не было обнаружено статистически значимых различий в уровне иммунного ответа у мышей, иммунизированных вакцинными штаммами, подготовленными на разных донорах аттенуации. Эти результаты позволяют предположить, что, вакцинные штаммы, подготовленные на более аттенуированном, чем базовый, доноре В/14/710, способны стимулировать адекватный иммунный ответ.

Таким образом, в результате проведенных исследований был отобран и фенотипически охарактеризован чистый клон В14/710 ХА вируса В/Ленинград/14/17/55, более аттенуированный, чем базовый донор В/СССР/60/69, но не уступающий ему по иммуногенности, и установлены механизмы его аттенуации. Предстоят дальнейшие доклинические и клинические испытания, необходимые для его внедрения в практику как донора аттенуации типа В живой гриппозной вакцины для защиты от гриппа детей в возрасте одного года и старше.

ГЛАВА 4. ЭКСПРЕСС-СКРИНИНГ РЕАССОРТАНТОВ ВИРУСА ГРИППА ТИПА В МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Методы анализа состава генома вакцинных штаммов должны быть простыми в исполнении, быстрыми и малозатратными, поскольку это влияет на стоимость подготовки вакцинного штамма. В этой связи мы разработали модификацию нового, оперативного и экономичного метода анализа, основанного на технологии пиросеквенирования [57, 132, 147]. Мы адаптировали этот метод для генотипирования реассортантов вируса гриппа В, подготовленных на основе современных штаммов вируса гриппа В и доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В/Ленинград/14/17/55, с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen).

4.1. Разработка протокола пиросеквенирования для генотипирования реассортантов живой гриппозной вакцины путем анализа коротких участков последовательности с использованием PyroMark Q24

Система генетического анализа PyroMark позволяет осуществлять секвенирование коротких участков последовательности генома, с количественным определением состава смеси в участках однонуклеотидных полиморфизмов. Разработанный нами протокол генотипирования реассортантов основан на секвенировании переменных участков последовательности генов вирусов гриппа В. Были разработаны комплекты праймеров, позволяющие осуществить амплификацию участков генов различных вирусов гриппа В, и их последующее секвенирование, что позволяет определить происхождение гена вируса в образце и анализ состава смеси в случае, если в образце присутствует смесь вирусов гриппа В.

Пары праймеров этапа ПЦР были подобраны к консервативным участкам последовательности генов так, чтобы амплифицировать фрагменты, содержащие переменные участки. Это позволяет осуществить амплификацию в одной реакции всех компонентов смеси. Для выявления консервативных участков последовательности генов было сделано множественное выравнивание последовательностей вирусов гриппа В, циркулировавших с 1940 по 2018 годы, доступных в Influenza Research Database (www.fludb.org). Такое выравнивание позволило подобрать праймеры для генотипирования реассортантов, полученных на основе современных эпидемических вирусов гриппа В и двух доноров аттенуации - донора, используемого в настоящее время для подготовки штаммов коммерческой отечественной ЖГВ (В60), и альтернативного донора - В14.

Праймеры этапа ПЦР подбирались к консервативным участкам вирусов, фланкирующим переменные участки, таким образом, чтобы общая длина фрагмента составляла от 100 до 500

пар нуклеотидов. Один из олигонуклеотидов в каждой паре должен быть соединен с биотином на 5'-конце. Биотин связывается со стрептовидином, осажденным на частицах сефарозы, что позволяет осуществить разделение цепей ДНК при подготовке пробы к реакции секвенирования. Отжиг праймера этапа секвенирования происходит на участок онДНК, расположенный за биотинилированным праймером.

Для дальнейшего определения принадлежности отдельных генов реассортантов к «родительским» штаммам праймеры этапа пиросеквенирования подбирались к консервативным фрагментам, сразу за которыми начинались высоко вариабельные участки последовательности исследуемых «родительских» вирусов (табл. 4.1).

Таблица 4.1 Последовательность праймеров этапов ПЦР и пиросеквенирования для генотипирования реассортантов вируса гриппа В

Сегмент генома	Праймеры этапа ПЦР	Праймеры этапа секвенирования
	Последовательность праймера, 5' → 3'	Последовательность праймера, 5' → 3'
PB2	AATCCACAAACAGAAGTCCTAAC	AGATCAATGGGGAATG
	Biotin ¹ - TTCTTTGTCTYTТААТТССТТGTG	
PB1	TACAGGCRGCAATTTCAACA	СТАСМГТТАТГАТГААГТАТ
	Biotin-TGТТСYTCATCCATТСТАТССА	
PA	TGTAGARTGGCTGCTTGGGTT	АТТАТСАСТАТАТГТГТСАГС
	Biotin-CCTTTAACC GCCAGACCRТА	
NP	АТТGGCTGCYACTGATGACAAGA	GATGACATAGARGAAGAACC
	Biotin- СТТСYТТССТТСТТТGACATCTC	
NA	TCAGGGGGAGTRTTATTATCACTA	ACAATAGACACCGTGAT
	Biotin-TTGAGCCCKGGCAAGATAAAC	
M	CATGTACCTGAAYCCTGGAAAYT	GCYACTGATGACAAGAAAAC
	Biotin-TCTGCATTT CYCGYCTCACT	
NS	GAAAAGCAATTGGRGTAAAААТG	AAACAAGCATCACATTC
	Biotin- TTTGTTGTTCATGTCCCTYAATAC	

Обозначения: ¹Праймер биотинилирован по 5'-концу

При генотипировании методом пиросеквенирования, важное значение имеет правильность задания порядка внесения нуклеотидов в реакционную смесь. Последовательности были составлены так, чтобы при анализе смеси пары вирусов (донор аттенуации и эпидемический вирус) каждому вирусу из пары соответствовали одиночные пики на пирограмме, свидетельствующие о наличии в смеси определенного гена данного вируса. Такой порядок внесения нуклеотидов позволяет осуществлять количественную оценку при анализе образцов, которые могут содержать смешанную популяцию вирусов, что часто происходит при подготовке

реассортанта ЖГВ и указывает на необходимость дополнительного клонирования. Последовательности внесения нуклеотидов представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Последовательность нуклеотидов на секвенируемом участке у изученных вирусов гриппа В, а также порядок внесения нуклеотидов в реакционную смесь при пиросеквенировании, позволяющий генотипировать анализируемые вирусы

Сегмент генома	Вирус ¹	Последовательность	Порядок внесения нуклеотидов
PB2	B60	CAGTACTGGCA	CAGTGATACTAGCA
	B14	CAGTACTAGCA	
	B/Ind, B/Br	CAGTATTAGCA	
	B/Ph, B/Mass	CAGTGTTGGC	
PB1	B60	TAGAACACATGA	TACAGACGACACTGA
	B14	TAGAACACACGA	
	B/Ind, B/Br	CAGAACGCATGA	
	B/Ph, B/Mass	CAGAACACATGA	
PA	B60	AGCTTTGACATGC	ATAGTGCTACTACATACT
	B14	GTACTIONTTTTCACA	
	B/Ind	GTGCTTTTTTCATACTT	
	B/Mass	GTGTT	
	B/Br	GTGCTTTTTTCACACTT	
	B/Ph	AGTTTCGACATGC	
NP	B60	TGAATCCAAAAGAAA	TGACGATCAGTCAG
	B14	TGAATACCAAAG	
	B/Ind, B/Br,	CGAGTTCCAG	
M	B60	ACATAGAGCCCA	ACATACAGAGCTCA
	B14	ACATAGAGCTCA	
	B/Ind, B/Br,	ACACAGGGCTCA	
	B/Ph	ACACAGAGCTCA	
NS	B60, B14	GGAAAATGTTGATGA	GAGAGTGTATGATGA
	B/Ind, B/Br	AGAGGATGTTGA	
	B/Ph, B/Mass	AGATGATGTTGA	

Обозначения: ¹Условные обозначения вирусов: B60 - В/СССР/60/69, В/Ind - В/Indiana/25/2015, В/Br - В/Brisbane/60/2008, В/Ph - В/Phuket/3073/2013, В/Mass - В/Massachusetts/02/2012, B14 – В/Ленинград/14/17/55

4.2. Обработка протокола пиросеквенирования для выявления нуклеотидной последовательности на выбранном переменном участке генома доноров аттенуации и диких вирусов

Для отработки протокола пиросеквенирования была произведена постановка реакции с вирусами гриппа B60, B14, B/Ind и B/Br (линия Виктория), B/Ph и B/Mass (линия Ямагата), а также с пробами, содержащими смесь двух вирусов (B14 и B/Ind) выраженному в 6,8 lg ЭИД₅₀/мл в соотношениях 1:1, 10:1, 1:10.

Для того чтобы убедиться в специфичности праймеров этапа ПЦР, был проведен электрофорез фрагментов, полученных после амплификации генов с праймерами, представленными в табл. 5.1. Поскольку праймеры амплифицируют один и тот же участок гена, на электрофорезе ПЦР-продукты, полученные при амплификации генов разных вирусов гриппа В, не отличаются. Пример электрофореграммы, полученной после амплификации фрагментов генов вируса гриппа В14, приведен на рисунке 4.1. При проведении электрофореза после постановки ПЦР с генетическим материалом всех перечисленных вирусов были получены фрагменты заданного размера. Полосы на электрофореграммах обладали высокой интенсивностью.

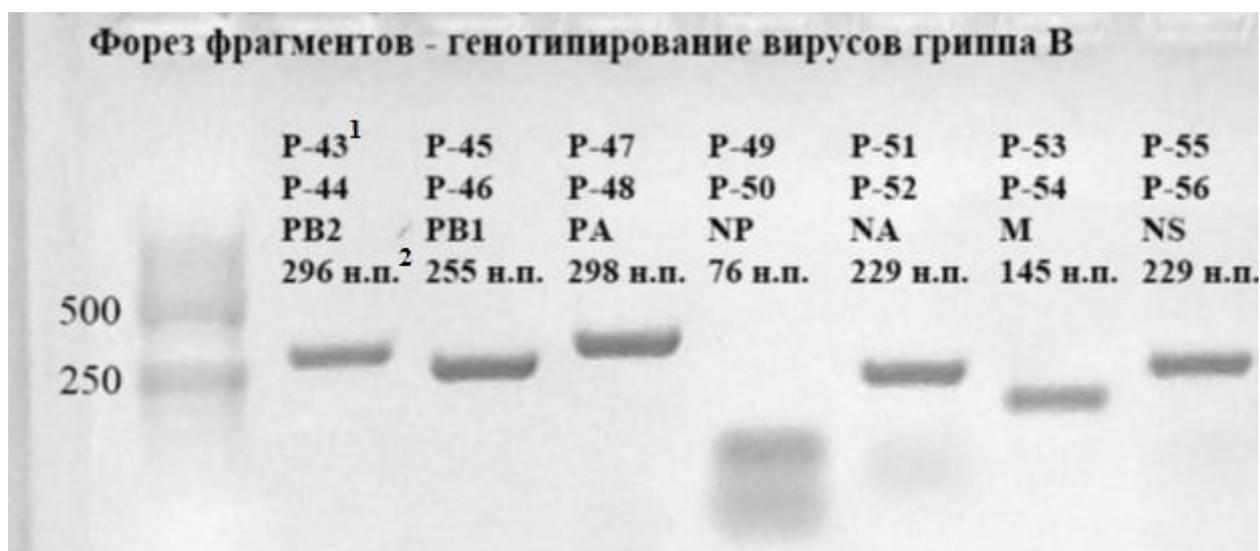


Рисунок 4.1 Электрофореграмма после амплификации биотинилированных праймеров этапа ПЦР. Обозначения: ¹Условные обозначения праймеров; ²Нуклеотидные пары.

Далее для подготовки протокола и для визуального отличия вирусов, было проведено пиросеквенирование фрагментов генов перечисленных вирусов. Полученные пирограммы представлены на рисунке 4.2.

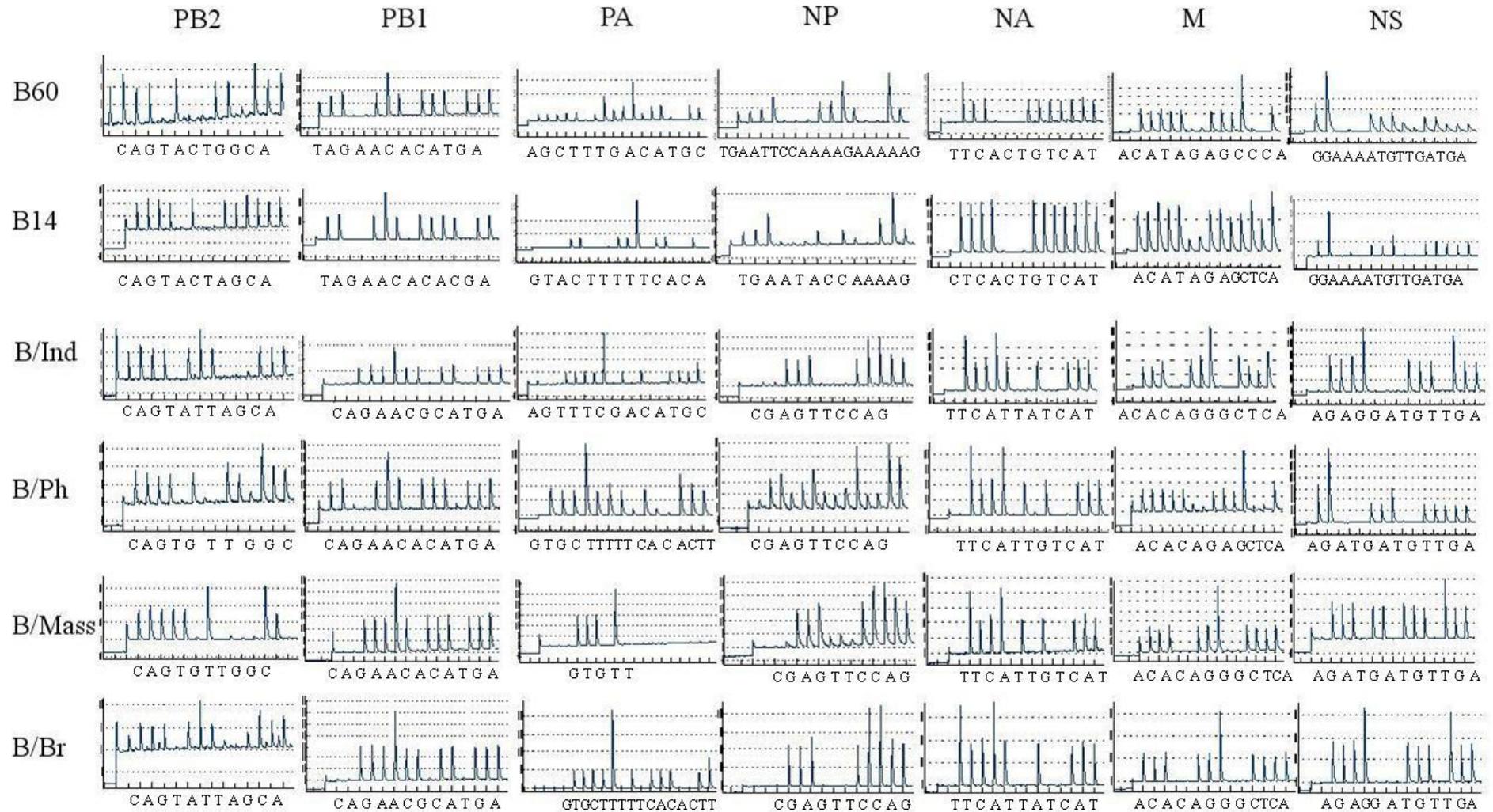


Рисунок 4.2 Пирограммы, полученные путем секвенирования участков генов вирусов B60, B14, B/Ind, B/Ph, B/Mass и B/Br методом пиросеквенирования

При подготовке вакцинных штаммов ЖГВ особое значение имеет чистота подготовленного вакцинного штамма, то есть отсутствие в нем примесей родительских вирусов и других реассортантов. Для оценки эффективности применения разработанного протокола для анализа смеси двух вирусов, было произведено выделение РНК из предварительно приготовленных смесей эпидемических вирусов с донорами аттенуации с последующим анализом полученного смешанного материала. Были использованы смеси резервного донора В14 с вирусами В/Indiana/25/2015, В/Brisbane/60/08 (линия Виктория); В/Phuket/3073/2013, В/Massachusetts/2/12 (линия Ямагата) в соотношениях 10:1, 1:1, 1:10, рассчитанных по инфекционному титру. При анализе смеси вирусов на полученных пирограммах присутствовали пики, соответствующие наличию в пробе генов обоих вирусов. В случае низкой концентрации одного из вирусов в пробе, на пирограмме, тем не менее, присутствовали различимые пики, по которым можно было детектировать наличие даже минимальной примеси соответствующего вируса в образце (рисунок 4.3).

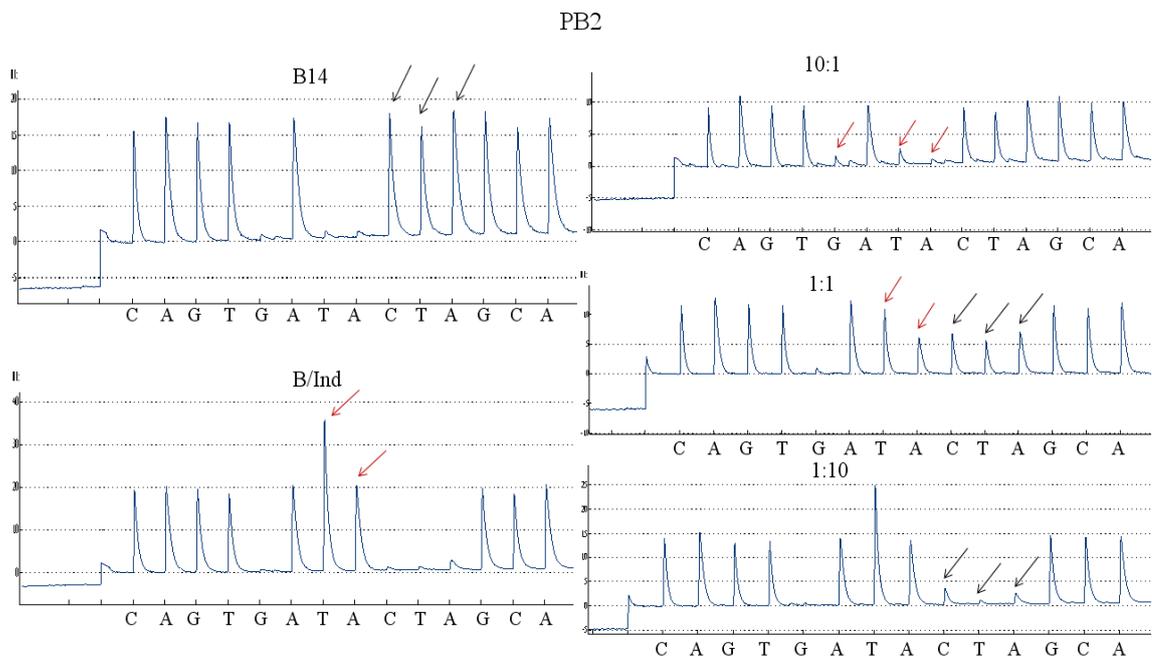


Рисунок 4.3 Пирограммы чистых и смешанных реассортантов вирусов гриппа В. Участок гена PB2 вирусов В/Ленинград/14/17/55, В/Indiana/25/2015 и их смеси в соотношении 10:1, 1:1, 1:10. Обозначения: Черными стрелками обозначены пики, являющиеся индикаторами присутствия сегмента генома донора аттенуации, красными стрелками – В/Indiana/25/2015.

4.3. Генотипирование реассортантов

Модифицированный метод пиросеквенирования был использован для определения принадлежности генов реассортантов между донорами В14 и В60 и четырьмя эпидемическими вирусами гриппа В (В/Ind, В/Mass, В/Ph, В/Br), (таблица 4.3). В результате использования данного метода в течение двух недель нам удалось проанализировать более 300 реассортантов, из них 50 образцов оказались смесью. Всего было отобрано около 40 реассортантов, наиболее

перспективных для получения вакцинных штаммов. Это позволило оперативно получить четыре реассортанта с вакцинной формулой генома 6:2.

Определение происхождения сегментов генома реассортантов на основе донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и эпидемического вируса В/Indiana/25/2015

Вирусы В14 и В/Ind скрещивали в развивающихся куриных эмбрионах по стандартной методике, далее было проведено клонирование при пониженной температуре в присутствии антисыворотки к альтернативному донору В14. Затем, для более оперативного и эффективного получения реассортанта-кандидата вакцинного штамма, уже после первого клонирования мы определяли состав генома реассортантов, собранных из предельных разведений. Большая часть реассортантов на данном этапе представляла собой смесь родительских вирусов (табл. 4.3). Определение состава генома уже после первого клонирования позволило нам выбрать наиболее перспективные для дальнейшей работы реассортанты (№15 и №16) и в несколько раз сократить объем работы второго клонирования, вместе с чем снизить затраты на подготовку вакцинного штамма.

Таблица 4.3 Состав генома реассортантов, полученных при скрещивании В/Ленинград/14/17/55 и В/Indiana/25/2015, I клонирование

№ клона	Сегмент генома							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	В/Ind	В/Ind	В/Ind	В14	смесь	В14	В14	В/Ind
2	смесь	В/Ind	В/Ind	В14	смесь	В/Ind	В14	В14
3	смесь	В/Ind	В/Ind	В14	В/14	В/Ind	В/Ind	В14
4	В/Ind	В/Ind	смесь	В14	смесь	смесь	В14	В/Ind
5	В/Ind	смесь	В14	В14	смесь	В14	В14	В14
6	смесь	В14	В14	В14	смесь	В14	В14	В14
7	В14	смесь	В14	В14	смесь	В14	В14	В14
8	В14	В14	В14	В/Ind	смесь	В14	В14	В14
9	В14	В14	В/Ind	В/Ind	В14	В14	В/Ind	В14
10	В14	В14	В14	В/Ind	смесь	В14	В14	В14
11	смесь	В14	смесь	В14	смесь	В14	смесь	смесь
12	В14	В14	В14	В14	В14	смесь	смесь	смесь
13	смесь	смесь	смесь	В14	В14	В14	В14	В14
14	В14	В14	смесь	В14	смесь	смесь	В14	В14
15	смесь	В14	смесь	В/Ind	В14	смесь	смесь	В14
16	В14	смесь	В14	В/Ind	В14	смесь	В14	В14
17	смесь	смесь	смесь	В14	В14	В14	В14	смесь
18	смесь	В14	смесь	В14	В14	В14	В14	В14

В результате второго клонирования перспективных реассортантов №15 и №16, ряд полученных клонов также представлял собой смесь, но другие образцы представляли собой чистые клоны. Среди этих чистых клонов присутствовал реассортант №81 с формулой генома 6:2 (табл. 4.4). Для подтверждения формулы генома и для полногеномного секвенирования

реассортанта-кандидата в вакцинные штаммы использовался метод секвенирования по Сэнгеру, в результате чего было подтверждено происхождение сегментов генома и отсутствие дополнительных мутаций, влияющих на фенотипические и антигенные свойства реассортанта.

Таблица №4.4 Состав генома реассортантов, полученных при скрещивании В/Ленинград/14/17/55 и В/Indiana/25/2015, II клонирование

№ клона	Сегмент генома							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
22	- ¹	B/Ind	B/Ind	B/Ind	-	смесь	-	смесь
27	-	B/Ind	смесь	B/Ind	-	B/Ind	-	-
29	B14	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B14	B/Ind	B14	B14
32	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B14	B14	B14	B/Ind
36	смесь	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B14	B/Ind	B/14	B/14
38	B14	B14	B/Ind	B/Ind	B14	B14	B14	B14
46	B14	смесь	B14	B/Ind	B14	B14	B14	B14
53	B14	B14	B14	B/Ind	смесь	B14	B14	B14
59	B14	B14	смесь	B/Ind	B14	смесь	смесь	смесь
63	B14	B14	смесь	B/Ind	B14	смесь	B14	B14
64	B14	B14	В/Инди	B/Ind	B14	B14	B14	B14
66	B14	B/Ind	B/14	B/Ind	B14	B14	B14	B14
70	B/Ind	B14	смесь	B/Ind	B14	смесь	B14	B14
73	B/Ind	смесь	B14	B/Ind	смесь	B14	смесь	смесь
76	B/Ind	B14	B14	B/Ind	B14	B/Ind	B14	B14
78	B14	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B14	B14	B/Ind	B/Ind
79	B14	B/Ind	B/Ind	B/Ind	B14	B14	B/Ind	B14
81	B14	B14	B14	B/Ind	B14	B/Ind	B14	B14

Обозначения: ¹ – не определяли

Такой же подход был применен при подготовке вакцинных штаммов на основе альтернативного донора B14 и эпидемических вирусов В/Mass, В/Ph, В/Bг, а также донора B60 с эпидемическим вирусом В/Ph. Реассортант, подготовленный на основе B60 и В/Ph - В/60/Phuket/2013/26 - в дальнейшем был получен патент РФ [23] и вошел в состав трехвалентной живой гриппозной аттенуированной вакцины на эпидемический сезон 2015-2018 гг.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АТТЕНУАЦИИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА В

Три основных свойства доноров аттенуации определяют аттенуацию вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе – это *ts/ca/att* фенотипы. Эти свойства обусловлены наличием стабильных аттенуирующих мутаций в геноме ХА доноров аттенуации. У известных к настоящему времени ХА доноров аттенуации обнаружено большое количество уникальных мутаций, расположение которых у разных доноров не совпадает. Для установления молекулярных основ аттенуации вируса гриппа необходимо исследовать роль каждого гена, кодирующего «внутренние» белки донора аттенуации, в которых находятся уникальные аминокислотные замены.

Для выяснения роли генов в формировании аттенуации вируса гриппа В, мы использовали резервный донор аттенуации В/14/710, официально разрешенный донор В60 и эпидемические вирусы гриппа В разных лет выделения.

5.1 Получение реассортантных штаммов вируса гриппа В на основе альтернативного донора В14/710

Для оценки вклада генов в формирование аттенуирующего фенотипа, проводилось скрещивание донора В14/710 с температуроустойчивыми (*non-ts*) эпидемическими вирусами гриппа В, принадлежащим к различным генетическим линиям. В работе использовали вирусы В/Massachusetts/2/12 (линия Ямагата), В/Indiana/25/15 (линия Виктория) и В/Lee/40, циркулировавший до расхождения ветвей.

Скрещивание альтернативного донора В14 с «дикими» вирусами проводили как по стандартной методике подготовки штаммов (32°C) ЖГВ [3], так и при разных температурных режимах (32°C, 37°C, 26°C) для получения разнообразных сочетаний генов у реассортантов. Была получена коллекция из более четырехсот реассортантов с различными сочетаниями генов от альтернативного донора и эпидемических вирусов - 2:6, 6:2, 5:3, 3:5, 1:7, 7:1 и т. д. Для определения состава генома полученных полигенных и одногенных реассортантов, применялся специально разработанный нами для скрининга большого числа образцов протокол на основе пироквенирования (см. раздел 4).

Кроме того, было проведено скрещивание официального В60 и альтернативного В14/710 доноров, в результате чего было получено 23 реассортанта. Все полученные реассортанты оказались с формулой генома 7:1 – одногенные по гену PB₁_{В14/710} (с генами PB₂, PA, HA, NP, NA, M, NS от донора В14/710; и генами PB₁ от В60).

5.2 Роль генов в формировании температурочувствительного фенотипа альтернативного донора В14/710

После определения состава генома реассортантов проводился фенотипический анализ для выявления роли генов в формировании *ts* фенотипа. Анализ проводили многократно (по 4 повторения), путем параллельной инкубации зараженных РКЭ при оптимальной и повышенной (до 37 °С) температуре инкубации. Поскольку одной из главных задач нашей работы было выяснение роли отдельных генов в аттенуации реассортантов, а *sa* фенотип не участвует в аттенуации [39,172], главной нашей задачей было определение именно *ts* фенотипа реассортантов.

Изучение влияния генов на *ts* фенотип реассортантов (таблица 5.1) показало, что для проявления температурочувствительного фенотипа достаточно наследования от донора В14/710 только генов полимеразного комплекса, причем сочетание генов PA и PB2 от донора В14/710 при «диком» PB1 уже обеспечивало температурочувствительный фенотип реассортанта, независимо от генетической линии, к которой относится «дикий» родитель.

Таблица 5.1 Роль генов в формировании температурочувствительного фенотипа

Формула генома	Кол-во вирусов	*Гены унаследованы от:		Фенотип при 37 °С
		ХА донора аттенуации	WT вируса	
7:1	3	PB2, PB1, PA, NP, NA, M, NS	HA	<i>ts</i>
6:2	3	PB2, PB1, PA, NP, M, NS	HA, NA	<i>ts</i>
	4	PB2, PB1, NP, NA, NS	PA, HA	<i>ts</i>
	5	PB2, PA, NP, NA, M, NS	PB1, HA	<i>ts</i>
5:3	15	PB2, PB1, NP, NA, NS	PA, HA, M	<i>ts</i>
	19	PB2, PB1, PA, NP, NS	HA, NA, M	<i>ts</i>
	7	PB2, PB1, PA, NA, NS	HA, NP, M	<i>ts</i>
	4	PB2, NP, NA, M, NS	PB1, PA, HA	<i>ts</i>
4:4	9	NS, M, NP, PB2	PB1, PA, HA, NA	<i>ts</i>
	4	PB2, PB1, PA, M	HA, NP, NA, NS	<i>ts</i>
3:5	15	NP, NA, M	PB2, PB1, PA, HA, NS	<i>non-ts</i>
	2	PB2, PB1, NS	PA, HA, NP, NA, M	<i>ts</i>
	7	PB2, PB1, PA	HA, NP, NA, M, NS	<i>ts</i>
2:6	6	M, NS	PB2, PB1, PA, HA, NP, NA	<i>non-ts</i>
	3	NP, NS	PB2, PB1, PA, HA, NA, M	<i>non-ts</i>
	6	NA, M	PB2, PB1, PA, HA, NP, NS	<i>non-ts</i>
	5	PB2, PA	PB1, HA, NP, NA, M, NS	<i>ts</i>
1:7	2	NP	PB2, PB1, PA, HA, NA, M, NS	<i>non-ts</i>
	3	NA	PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS	<i>non-ts</i>

Как видно из таблицы 5.1, сочетания генов PB1+PB2 от донора В14/710 при наследовании третьего гена от «дикого» родителя также обеспечивало *ts* фенотип, кроме того, наличие только PB2 сегмента от донора в геноме реассортантов с разным сочетанием генов полимеразного

комплекса также приводило к температурочувствительности реассортантов. У реассортантов, сохранивших *non-ts* фенотип, в обязательном порядке хотя бы один ген из пары PB2+PA был унаследован от эпидемического родителя. Наследование гена NP от B14/710 в отдельных случаях приводило к появлению *ts* фенотипа даже при условии наличия в полимеразном комплексе только одного «холодного» гена, что говорит о важной роли взаимодействия донорских белков в определении *ts* фенотипа.

5.3 Роль генов в формировании аттенуирующих свойств вирусов гриппа В

На следующем этапе нашей работы мы провели изучение аттенуирующего фенотипа реассортантов в экспериментах на животных (мышях). Аттенуирующий фенотип оценивался по уровню репликации реассортантов в легочной ткани мышей, как это описано в разделе 2.2.

Изучение уровня репликации реассортантов в легочной ткани мышей подтвердило результаты фенотипического анализа. Так же как при оценке температурочувствительности, реассортанты, содержащие все три гена PB2, PB1, PA полимеразного комплекса от ХА родителя B14/710, не отличались по уровню репликации от самого альтернативного донора, также как и реассортанты, содержащие от донора два полимеразных гена PB2 и PA, вне зависимости от генетической линии эпидемического родителя. И, напротив, реассортанты, унаследовавшие гены полимеразного комплекса от «дикого» родителя, имели достоверно более высокое содержание вируса в легочной ткани мышей, чем у ХА донора, схожее с эпидемическим родителем (таблица 5.2).

Таблица 5.2 Репликация *ts* реассортантов в легких мышей на 3 сутки после интраназального заражения

Вирусы	Ген								Титр вируса в легких (lg ЭИД/мл/г)
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
Родительские вирусы									
B14/710	B14	2,5 ± 0,21							
B/Lee	wt	7,9 ± 0,47							
B/Mass	wt	6,2 ± 0,50							
B/Ind	wt	6,0 ± 0,81							
Реассортанты на основе донора B14/710 и «диких» вирусов гриппа В									
Кол-во	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	Титр вируса в легких (lg ЭИД ₅₀ /мл/г)
2	B14	B14	B14	wt	B14	wt	B14	B14	1,9 ± 0,25
7	B14	B14	B14	wt	wt	wt	wt	wt	1,8 ± 0,97
5	B14	wt	B14	wt	wt	wt	wt	wt	2,3 ± 0,28
9	B14	wt	wt	wt	B14	wt	B14	B14	2,2 ± 0,23

5.4 Влияние мутаций в гене PB1 на формирование аттенуирующих свойств донора В14/710

Ранее было показано, что именно гены, кодирующие нуклеопротеиновый комплекс (PB2, PB1, PA, NP) играют определяющую роль в аттенуации [48,50,176,182]. Донор В/14/710 содержит мутации во всех четырех генах NP-комплекса в отличие от донора В60, несущего мутации только в двух полимеразных генах. Поэтому можно было ожидать, что включение в состав генома одногенного реассортанта В14–60 немутантного PB1 гена приведет к некоторому снижению его аттенуирующих свойств по сравнению с донором В/14/710. Однако, при исследовании фенотипических особенностей реассортанта В14–60 были получены неожиданные результаты (рис.5.1).

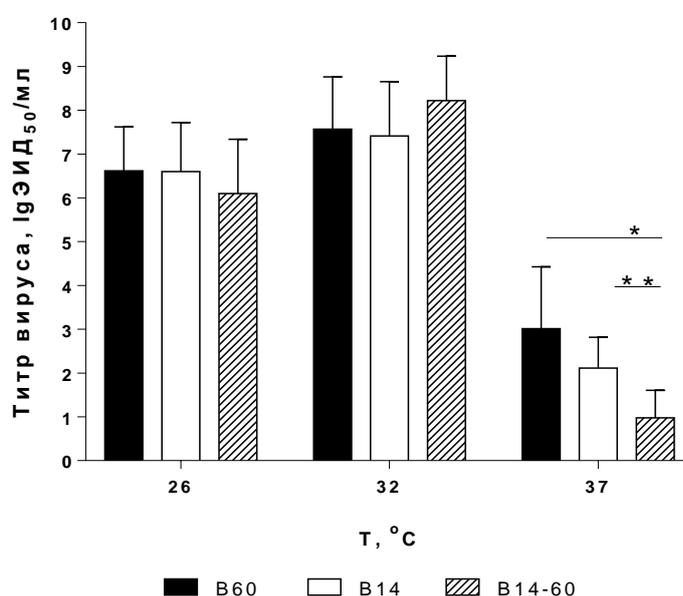


Рисунок 5.1 Инфекционные титры доноров аттенуации ЖГВ и их реассортанта В14–В60 при разных температурах инкубации. Обозначения: * ($p=0,010$); ** ($p=0,018$), Критерий Манна–Уитни.

Изучение фенотипической характеристики реассортанта В14–60 показало, что он не только сохранил свойство холодной адаптации на уровне родительских вирусов, но, вопреки ожиданиям, был статистически достоверно более температурочувствителен, чем каждый родительский штамм по отдельности. Таким образом, разобщение генов полимеразного комплекса вируса В14/710 с включением в него немутантного PB1 гена от донора В60 привело к усилению *ts* фенотипа 7:1 реассортанта В14–60.

Изучение уровня репродукции реассортанта В14–60 в легких мышей показало, что он был более аттенуированным для животных, чем исходные родительские вирусы (табл. 5.3).

Таблица 5.3 Интенсивность репродукции доноров аттенуации и одногенного реассортанта на их основе в легких мышей

Сутки	Титр вируса в легких (lg ЭИД/мл/г)		
	В60	В14/710	В14-60
1	3,3 ($\pm 0,56$)	2,26 ($\pm 0,53$)	0,96 ($\pm 0,26$)
3	3,1 ($\pm 0,7$)	2,5 ($\pm 0,21$)	2 ($\pm 0,65$)
5	1,8 ($\pm 0,77$)	1,5 ($\pm 0,86$)	0,7 ¹
7	0,7 ¹	0,7 ¹	0,7 ¹

Обозначения: ¹Титр вируса был ниже детектируемого уровня.

В первые сутки после заражения значение титра реассортанта В14–В60 в легких животных было статистически достоверно ниже титра родительского вируса В60 (критерий Манна–Уитни $U=0$, $Z=1,99$, $p=0,046$), уже на пятые сутки реассортантный вирус не детектировался в легких, в то время как В60 и В14/710 были выделены из легких животных. На седьмые сутки ни один из исследованных вирусов в легких мышей не обнаруживался.

Эти результаты еще раз подтверждают (1) высокую аттенуацию одногенного реассортанта В14–60, достоверно превышающую таковую родительских донорских вирусов и (2) факт прямой зависимости между температурочувствительным фенотипом ХА вируса и его аттенуацией, впервые установленный Киселевой с соавт. [95].

ГЛАВА 6. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОТЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ СОДЕРЖАЩЕЙ АНТИГЕННО ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ЛИНИИ ВИРУСА ГРИППА В

Другим направлением нашей работы, также связанным с расширением сферы применения современной живой гриппозной вакцины, являлось изучение защитного потенциала вакцин, содержащих антигенно отличающиеся штаммы вируса гриппа В.

Социркуляция двух генетически разных линий вируса гриппа В – В/Vic и В/Yam, заставляет задуматься о решении проблемы несоответствия между входящими в состав вакцины и циркулирующими штаммами вируса гриппа В.

В настоящем разделе сделана попытка оценки возможной перекрестной протективности живой гриппозной вакцины, содержащей штаммы вируса гриппа В, принадлежащие к разным генетическим линиям. Были проведены исследования реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69, поскольку современная эпидемиологическая ситуация требует немедленного решения вопроса о перспективности применения трехвалентных ЖГВ в случае несовпадения их штаммового состава с циркулирующими вирусами гриппа В. В качестве моновалентных вакцин типа В были использованы вакцинные штаммы, подготовленные на основе эпидемических вирусов В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) или В/Brisbane/60/08 (В/Vic) и донора В60. В состав поливалентных вакцин входили те же вакцинные компоненты вируса гриппа В генетических линий В/Vic и В/Yam, которые были использованы в качестве моновакцин (табл. 6.1).

Таблица 6.1 Состав вакцин, использованных в экспериментах на хорьках

Вакцина	Вакцинные штаммы подготовлены на основе следующих WT вирусов:
Моновалентная М–ЖГВ	В/Phuket/3073/2013 (В/Yam)
Моновалентная М–ЖГВ	В/Brisbane/60/08 (В/Vic)
Трехвалентная (Т–ЖГВ)	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09 А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) В/Phuket/3073/2013 (В/Yam)
Трехвалентная (Т–ЖГВ)	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09 А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) В/Brisbane/60/08–like (В/Vic)
Квадвалентная (К–ЖГВ)	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09 А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) В/Brisbane/60/08–like (В/Vic)

6.1 Кросс–протективность живой гриппозной моновалентной вакцины типа В

В первой серии экспериментов была проведена оценка возможной кросс–протективности живой гриппозной моновалентной вакцины (М–ЖГВ) из штаммов вируса гриппа В, принадлежащих к генетическим линиям В/Vic (В/Brisbane/60/08) и В/Yam (В/Phuket/3073/2013). Хорьки были разделены на 7 групп по 3 животных в каждой. Группы 1 и 2 были проиммунизированы М–ЖГВ линии В/Vic, группы 3 и 4 – моновакциной из вируса линии В/Yam, группы 5 и 6 получили интраназально фосфатно–солевой буферный раствор (PBS, контроль челлендж–вируса). Спустя 21 день после иммунизации, животных 1, 4 и 5 группы заражали эпидемическим челлендж–вирусом линии В/Vic (В/Brisbane/60/08), а 2, 3 и 6 группы – эпидемическим челлендж–вирусом линии В/Yam (В/Phuket/3073/2013). Животные 7 (интактной) группы не были ни вакцинированы, ни заражены эпидемическим вирусом (табл. 6.2).

Таблица 6.2 Схема изучения кросс–протективности моновалентной ЖГВ типа В в экспериментах на хорьках

Группа № (препарат)	Компонент ЖГВ		Челлендж–вирус	
	В/Vic	В/Yam	В/Vic	В/Yam
1 М–ЖГВ (В/Vic)	+		+	
2 М–ЖГВ (В/Vic)	+			+
3 М–ЖГВ (В/Yam)		+		+
4 М–ЖГВ (В/Yam)		+	+	
5 (контроль)	PBS	PBS	+	
6 (контроль)	PBS	PBS		+
7 (интактная)				

Для эффективной оценки кросс-протективности М–ЖГВ в течение эксперимента все животные находились под наблюдением для оценки клинических симптомов заболевания, кроме того на третьи сутки после иммунизации и заражения у всех животных собирались назальные смывы и проводилось измерение температуры тела. В последний, 28 день эксперимента (спустя трое суток после заражения эпидемическими вирусами), у всех животных производился забор смывов, крови и легких.

6.1.1 Оценка степени аттенуации моновалентной живой гриппозной вакцины типа В на модели хорьков

Клинические наблюдения после иммунизации моновалентной ЖГВ

Никаких клинически значимых симптомов у иммунизированных животных не наблюдалось. У хорьков иммунизированных как М–ЖГВ (В/Vic), так и (В/Yam), регистрировались лишь слабые клинические симптомы, такие как слизь из носа и чихание, начиная с первого дня иммунизации (таблица 6.3).

Таблица 6.3 Проявление клинических симптомов у хорьков после иммунизации моновалентной живой гриппозной вакцины

Препарат	М-ЖГВ (В/Vic)				М-ЖГВ (В/Yam)				-			
	Д 0	Д 1	Д 2	Д 3	Д 0	Д 1	Д 2	Д 3	Д 0	Д 1	Д 2	Д 3
Дни												
Температура тела (°С)	38.4	38.3	38.7	38.8	38.7	38.8	38.9	38.8	38.5	38.7	38.6	38.7
Активность [Медиана (Q1-Q3)]	3.0 (3.0-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)	1.5 (0.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	2.5 (2.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)	3.0 (3.0-3.0)
Респираторные симптомы [Медиана (Q1-Q3)]	0.0 (0.0-0.0)	0.5 ¹ (0.0-1.0)	0.5 ¹ (0.0-1.0)	0.5 ¹ (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.0 ¹ (1.0-1.0)	1.0 ¹ (1.0-1.0)	1.0 ¹ (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)

Обозначения: ¹ Медианный тест между группами, $p \leq 0,05$, (по сравнению с интактной группой).

Как видно из таблицы, активность иммунизированных животных незначительно снизилась в первый и второй день после иммунизации, но нормализовалась на третий день. Изменения в температуре тела среди иммунизированных животных существенно не отличались от изменений в интактной группе хорьков. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии побочных эффектов на состояние животных при иммунизации штаммами ЖГВ В/60/Brisbane/08/83 и В/60/Phuket/2013/26, что, в свою очередь, свидетельствует о аттенуированности данных штаммов для модели хорьков.

Репликация вирусов в верхних дыхательных путях хорьков после иммунизации моновалентной ЖГВ

У всех хорьков, спустя трое суток после иммунизации собирались назальные смывы, которые затем титровались в РКЭ для оценки интенсивности репликации аттенуированного вируса в ВДП животных (таблица. 6.4).

Таблица 6.4 Репликация вирусов в верхних дыхательных путях хорьков после иммунизации моновалентной ЖГВ

Препарат	Группа	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл)
М–ЖГВ (В/Vic)	1 и 2	3.88 ± 0.119 (6/6)
М–ЖГВ (В/Yam)	3 и 4	3.68 ± 0.120 (6/6)
-	5,6 и 7	< 1.5 (0/9)

Как видно из таблицы, у всех иммунизированных животных была детектирована репликация вируса в ВДП (от 3,7 до 3,9 lg ЭИД₅₀/мл). В интактной группе животных, как и предполагалось, репликация вируса не наблюдалась.

6.1.2 Оценка защитных свойств моновалентной живой гриппозной вакцины типа В на модели хорьков в челлендж-эксперименте

Клинические наблюдения после инфицирования хорьков эпидемическими вирусами

У контрольной группы хорьков, проявлялось более выраженное снижение активности, чем иммунизированных и интактных животных (табл.6.5). Общее состояние животных, ранее иммунизированных как М–ЖГВ (В/Vic), так и (В/Yam), было близко к нормальному физиологическому состоянию и сильно не отличалось от интактной группы животных. Хорьки, иммунизированные М–ЖГВ (В/Yam) и зараженные гомологичным вирусом (В/Yam), имели статистически достоверно более высокий уровень активности, чем контрольная группа хорьков, не получившая предварительную иммунизацию ($p < 0,05$).

У контрольных животных, зараженных как вирусом линии В/Vic, так и В/Yam, повышенная температура тела регистрировалась уже на следующий день после заражения и

сохранялась в течение последующих двух дней.

Таблица 6.5 Проявление клинических симптомов у хорьков в челлендж-эксперименте

Вирус	Температура тела (°C)				Активность			
	День эксперимента							
	Д 21	Д 22	Д 23	Д 24	Д 21	Д 22	Д 23	Д 24
После челленджа вирусом В/Br								
М–ЖГВ (В/Vic)	38.7	38.4	38.8	38.5	3.0	2.0	2.3	2.7
М–ЖГВ (В/Yam)	38.8	38.4	38.5	38.2	3.0	2.3	2.3	2.3
В/Vic	38.9	39.2	39.0	38.5	3.0	1.0 ¹	1.7 ¹	2.3
-	38.5	38.4	38.8	38.4	3.0	3.0	3.0	3.0
После челленджа вирусом В/Ph								
М–ЖГВ (В/Yam)	38.7	38.6	39.0	38.6	3.0	2.3	2.3	3.0 ²
М–ЖГВ (В/Vic)	38.7	38.3	38.2	38.7	3.0	1.7	1.7 ¹	2.3
В/Yam	38.8	39.1	39.2	38.8	3.0	1.3 ¹	1.7 ¹	2.0 ¹
-	38.5	38.4	38.8	38.4	3.0	3.0	3.0	3.0

Обозначения: ¹тест Даннетта, $p \leq 0.05$ (по сравнению с интактной группой); ²тест Даннетта, $p \leq 0.05$ (иммунизированных животных по сравнению с интактной группой)

И напротив, у иммунизированных хорьков не было выявлено повышения температуры, после заражения эпидемическими вирусами. Таким образом, одна доза М–ЖГВ (В/Vic и В/Yam), значительно снижает клинические симптомы при инфицировании эпидемическим вирусом гриппа типа В линии В/Vic и В/Yam.

Репликация вирусов в ВДП и НДП хорьков после инфицирования хорьков эпидемическими вирусами

Ни у одного из иммунизированных животных не было обнаружено репликации гетерологичного или гомологичного вируса в НДП (рис. 6.1)

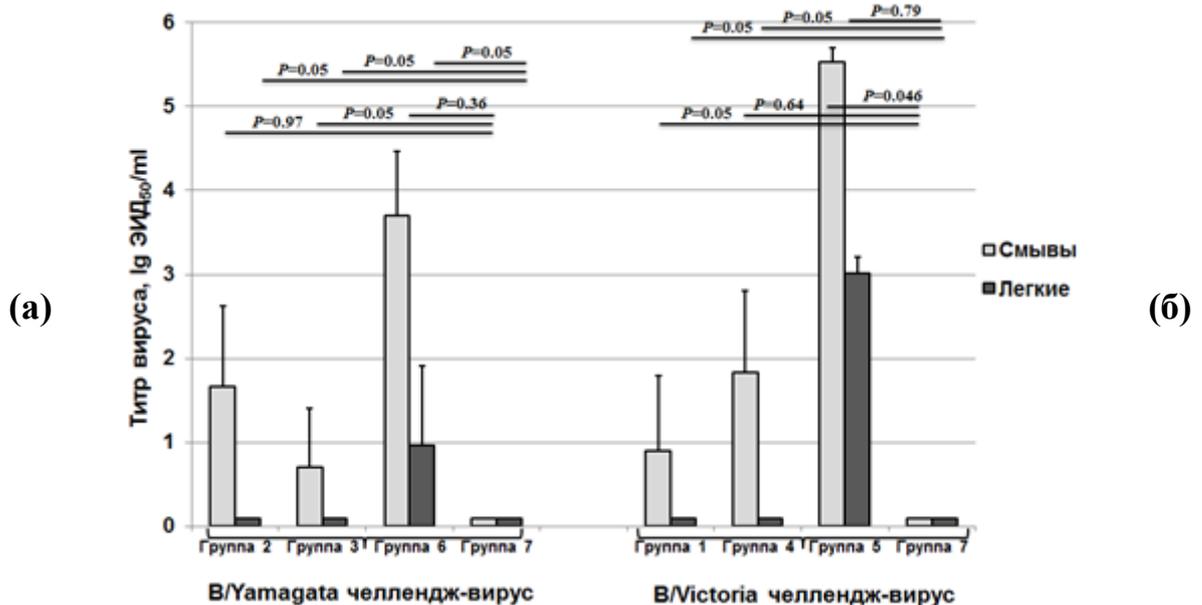


Рисунок 6.1 Репликация челлендж-вируса у хорьков, иммунизированных живой гриппозной моновакциной типа В. Обозначения: (а) после инфицирования вирусом линии В/Yam; (б) после инфицирования вирусом линии В/Vic.

У контрольных животных, зараженных эпидемическими вирусами, репликация вируса в легких в среднем составляла 3,01 lg ЭИД₅₀/мл на грамм ткани (зараженных вирусом В/Vic) и 0,96 lg ЭИД₅₀/мл на грамм ткани (зараженных вирусом В/Yam).

Что касается носовых смывов, то у иммунизированных животных М-ЖГВ было зарегистрировано наличие вируса в ВДП, однако титр вирусов был статистически достоверно ниже, по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$). У иммунизированных животных средние титры вирусов в ВДП варьировались от 0,7 до 1,83 lg ЭИД₅₀/мл, тогда как в контрольных группах они составляли 5,53 и 3,70 lg ЭИД₅₀/мл соответственно (рис.6.1 а,б).

6.1.3 Оценка уровня гуморального иммунного ответа в сыворотках крови хорьков в челлендж-эксперименте

До иммунизации, ни один из хорьков не имел антител к эпидемическим штаммам линии В/Vic и В/Yam. На 21 день эксперимента у всех иммунизированных хорьков наблюдался четырехкратный прирост титра антител к гомологичному эпидемическому вирусу (табл.6.6). Для расчета среднего геометрического титра значение $< 1:10$ было заменено на абсолютное значение 5.0.

Таблица 6.6 Иммунный ответ у хорьков в челлендж-эксперименте

Препарат	Среднегеометрический титр антител в сыворотках крови, до и после иммунизации	
	В/Vic	В/Yam
	Д0 / Д21	Д0 / Д21
М-ЖГВ (В/Vic)	5.0 / 36.0	5.0 / 5.0
М-ЖГВ (В/Yam)	5.0 / 5.0	5.0 / 90.0
-	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0

Как видно из таблицы, не было обнаружено антигемагглютинирующих антител к гетерологичному вирусу все зависимости от получаемой ранее вакцины.

Таким образом, полученные результаты по изучению перекрестной протективности М-ЖГВ типа В показывают, что однократная иммунизация М-ЖГВ (В/Vic или В/Yam) защищает как от гомологичного, так и гетерологичного челлендж-вируса. Однако продемонстрированная перекрестная защита М-ЖГВ скорее всего, связана с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом, поскольку сывороточных антител на гетерологичный вирус (как В/Vic так и В/Yam) в реакции РТГА не было обнаружено.

6.2 Кросс-протективность живой гриппозной трехвалентной вакцины

Для изучения перекрестных защитных свойств Т-ЖГВ серонегативным хорькам интраназально вводили по 1,0 мл (по 0,5 мл в каждый носовой ход) ЖГВ или эпидемический

вирус. Две группы из трех хорьков были иммунизированы интраназально Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, В/Vic) в День0 (Д0) исследования (группа 1 и 2). Еще две группы из трех хорьков были иммунизированы интраназально Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, В/Yam) также в Д0 (группа 3 и 4). Две группы из трех хорьков были иммунизированы интраназально К–ЖГВ (H1N1, H3N2, В/Vic, В/Yam) в Д0 исследования (группа 5 и 6). Две дополнительные группы из трех хорьков, группы 7 и 8, использовались в качестве контроля, их заражали «дикими» вирусами гриппа. Последняя группа из трех хорьков (группа 9) была интактной (табл.6.7).

Таблица 6.7 Схема изучения кросс–протективности трехвалентной ЖГВ в экспериментах на хорьках

Группа № (препарат)	Компонент В ЖГВ		Челлендж–вирус	
	В/Vic	В/Yam	В/Vic	В/Yam
1 (Т–ЖГВ В/Vic)	+		+	
2 (Т–ЖГВ В/Vic)	+			+
3 (Т–ЖГВ В/Yam)		+	+	
4 (Т–ЖГВ В/Yam)		+		+
5 (К–ЖГВ)	+	+	+	
6 (К–ЖГВ)	+	+		+
7 (контроль)	PBS	PBS	+	
8 (контроль)	PBS	PBS		+
9 (интактная)				

Через 4 недели после иммунизации (Д28) хорьков из групп 1, 3, 5 и 7 заражали эпидемическим вирусом В/Brisbane/60/2008 (линии В/Vic) в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/мл. Хорьков из 2, 4, 6 и 8 групп заражали вирусом В/Phuket/3073/2013 (линии В/Yam).

В течение всего эксперимента хорьки находились под наблюдением для оценки клинических симптомов заболевания. Велась регистрация температуры тела и массы тела животных. С целью обнаружения вируса в ВДП животных, проводилось титрование носовых смывов на третий день после иммунизации и на 31 день эксперимента (третий день после заражения эпидемическими вирусами). Кроме того на 31 день эксперимента производился забор образцов легких животных, суспензии которых были также как и носовые смывы, титровали 10-ти кратными разведениями в РКЭ в течение 72 часов.

6.2.1 Оценка степени аттенуации живой гриппозной трехвалентной вакцины на модели хорьков

Клинические наблюдения после иммунизации Т–ЖГВ

Все иммунизированные животные в течение первых трех дней после иммунизации характеризовались положительной динамикой массы тела с тем же увеличением массы, что и интактные хорьки (группа 9). Клинические признаки, обнаруженные у хорьков после

иммунизации Т– или К–ЖГВ, представлены в таблице 6.8 в виде суммы баллов для каждой группы хорьков.

Таблица 6.8 Проявление клинических симптомов хорьков после иммунизации Т-ЖГВ

Препарат	Клинические проявления ¹				Масса тела ² , %			
	Д0	Д1	Д2	Д3	Д0	Д1	Д2	Д3
- (интактная группа)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;1)	100	100.8±0.38	99.9±1.03	99.3±1.16
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic)	0(0;0)	0(0;1)	0(0;1)	0(0;1)	100	98.0±0.64	96.5±0.84	95.7±1.23
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam)	0(0;1)	0(0;0)	0(0;1)	1(0;2)	100	100.8±0.63	98.8±0.81	97.9±1.20
К-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam)	0(0;1)	0(0;0)	1(0;1)	0.5(0;1)	100	99.1±0.61	97.9±0.97	96.8±1.36

Обозначения:¹Сумма баллов, Медиана (Q1;Q3). ²Относительное изменение массы тела между Д1 и Д28, %.

Как видно из таблицы, у всех иммунизированных животных отмечалось снижение общей активности до 1 балла. Один хорек, иммунизированный Т–ЖГВ (В/Yam), уменьшал активность до 2 баллов, на третий день эксперимента. Тем не менее, поведение животных экспериментальных групп (группа 1, 2, 3, 4, 5, 6) значительно не отличалось от интактных (группа 9) животных.

Что касается температуры тела животных, анализ дисперсии данных (ANOVA) не показал влияния введения вакцины на температуру тела животных ($p > 0,05$) (рис.6.2).

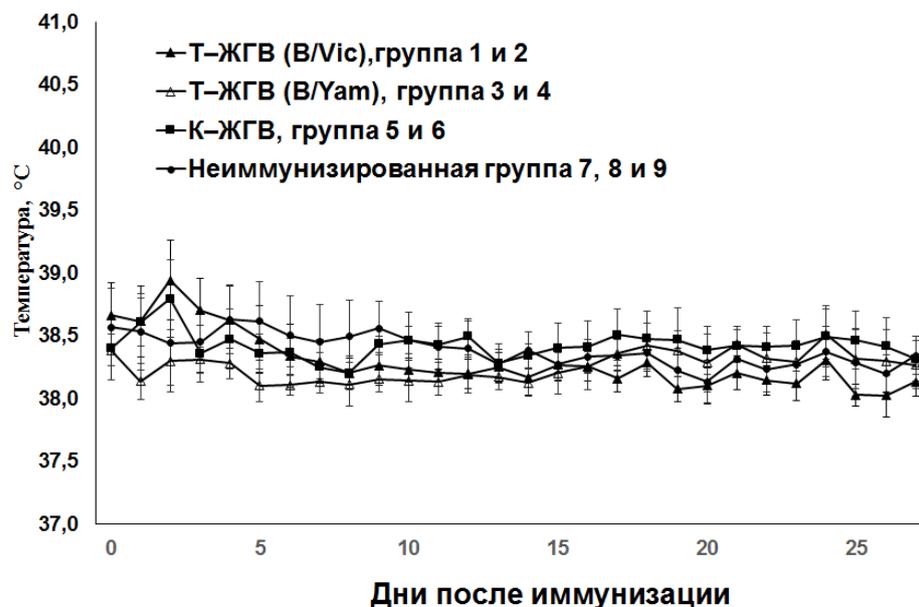


Рисунок 6.2 Температура тела животных после иммунизации Т-ЖГВ

На рисунке представлены данные температуры тела животных в течение 28 дней после введения вакцины, из которого видно, что температура тела иммунизированных хорьков, вне

зависимости от получаемой вакцины не отличается от интактной группы животных.

Репликация вирусов в ВДП хорьков после иммунизации Т-ЖГВ

Оценка интенсивности репликации вирусов в носовых ходах хорьков показала, что на третий день после иммунизации у всех хорьков реплицировался вирус в ВДП, вне зависимости от введенной вакцины, в отличие от интактной группы животных, у которой было продемонстрировано отсутствие вируса в ВДП (таб.6.9).

Таблица 6.9 Интенсивность репликация вируса в ВДП хорьков после иммунизации Т-ЖГВ

Вакцина	Группа	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл)
Т-ЖГВ(В/Vic)	1 и 2	4.53 ± 0.33 (6/6)
Т-ЖГВ (В/Yam)	3 и 4	4.38 ± 0.12 (6/6)
К-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam)	5 и 6	4.20 ± 0.12 (6/6)
-	7, 8 и 9	< 1.5 (0/9)

Как видно из таблицы 6.9 на третий день после иммунизации, репликация вируса в носовых ходах варьировала от 4,20 до 4,53 lg ЭИД₅₀/мл, как у хорьков иммунизированных Т-ЖГВ, так и Ч-ЖГВ, что свидетельствует о наличии вируса в ВДП всех иммунизированных животных.

6.2.2 Оценка защитных свойств живой гриппозной трехвалентной вакцины на модели хорьков в челлендж-эксперименте

Клинические наблюдения после инфицирования хорьков челлендж-вирусами В/Vic и В/Yam

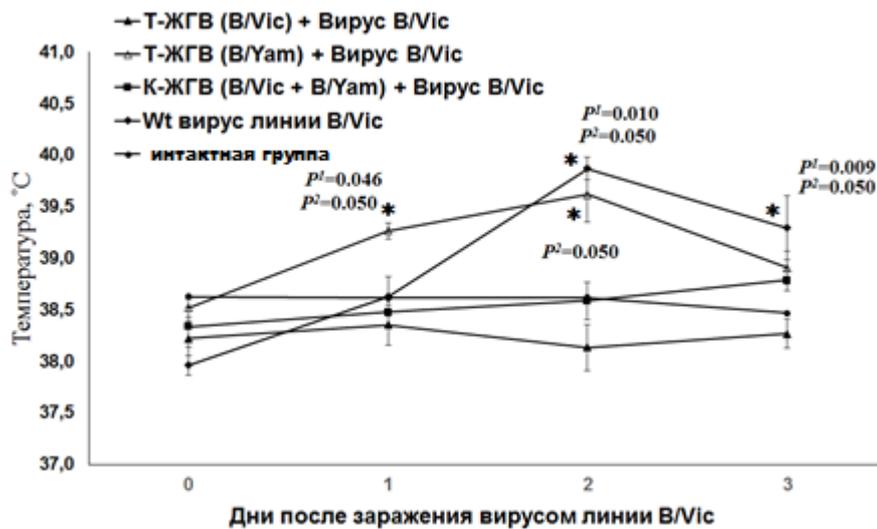
В таблице 6.10 представлены изменения массы тела и клинические проявления у хорьков, иммунизированных Т-ЖГВ в челлендж эксперименте. Масса тела иммунизированных хорьков, зараженных эпидемическими вирусами гриппа типа В (группы 1–6), существенно не отличалась от массы тела интактных хорьков (группа 9) вне зависимости от введенной вакцины. Минимальная потеря веса отмечалась у 1 группы животных (Т-ЖГВ В/Vic зараженные вирусом В/Vic) около 3%. Максимальная потеря веса была зафиксирована у 7 и 8 контрольных групп животных (более чем на 6%). Клинический ход зараженных хорьков групп 7 и 8 на 30 день эксперимента характеризовался более низкой общей активностью и появлением симптомов респираторной системы в виде кашля. Активность отдельных животных этих групп оценивалась как «вялая».

Таблица 6.10 Проявление клинических симптомов у иммунизированных хорьков в челлендж-эксперименте

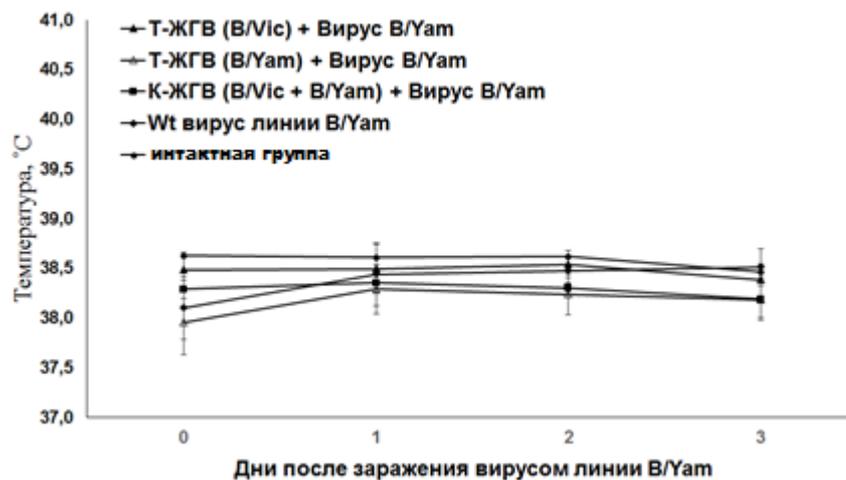
Иммунизированные хорьки зараженные эпидемическим вирусом гриппа линии В/Vic								
Группа животных	Клинические проявления ¹				Масса тела ² , %			
	Д28	Д29	Д30	Д31	Д28	Д29	Д30	Д31
Интактная	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	100	98.0±0.67	95.7±0.34	96.0±0.69
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)*	100	97.3±1.87**	96.4±1.40**	96.7±0.68**
Т-ЖГВ(Н1N1, Н3N2, В/Yam)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;1)	0(0;1)*	100	94.4±1.06	93.6±1.27	93.3±1.15
К-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)*	100	94.1±0.80	94.1±0.56**	94.9±0.51
Контрольная группа В/Vic	0(0;0)	0(0;1)	1(0;3)	4(2;4)	100	94.2±0.19	90.2±1.36	90.1±2.48
Иммунизированные хорьки зараженные эпидемическим вирусом гриппа линии В/Yam								
Группа животных	Клинические проявления				Масса тела, %			
	Д28	Д29	Д30	Д31	Д28	Д29	Д30	Д31
Интактная	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	100	98.0±0.67	95.7±0.34	96.0±0.69
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)*	100	94.9±1.45	94.8±1.41	94.0±1.71
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam)	0(0;0)	0(0;3)	0(0;0)	0(0;0)*	100	96.0±0.71	94.7±0.10	94.7±1.28
К-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam)	0(0;1)	0(0;1)	0(0;0)	0(0;0)*	100	93.6±3.18	93.4±2.76	93.3±1.69
Контрольная группа В/Yam	0(0;0)	0(0;1)	1(0;1)	2(1;3)	100	94.5±1.10	93.7±1.13	94.7±1.26

Обозначения: ¹Сумма баллов, Медиана (Q1;Q3). ²Относительное изменение массы тела между Д28 и Д31, %. * Крускала – Уоллиса, $p < 0,05$ (вакцинированные группы по сравнению с интактной группой); ** U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$ (вакцинированные группы по сравнению с интактной группой).

На рисунке 6.3 (а, б) представлены данные по измерению температуры тела хорьков после инфицирования эпидемическими вирусами гриппа типа В. Инфицирование животных эпидемическим вирусом гриппа В/Vic привело к значительному повышению температуры тела на 30-й день эксперимента в положительной контрольной группе 7, по сравнению с результатами в интактной группе 9 (ANOVA, $p < 0,05$), что указывает на развитие болезни у контрольных групп животных.



(а)



(б)

Рисунок 6.3 Динамика изменения температура тела хорьков, предварительно иммунизированных Т-ЖГВ или К-ЖГВ, после челленджа «дикими» вирусами гриппа. Обозначения: WT – дикий тип. Звездочка (*) над линиями указывает на статистически значимые различия по сравнению с интактной группой (ANOVA, $p < 0,05$). (а) после инфицирования хорьков вирусом линии В/Vic; (б) после инфицирования хорьков вирусом В/Yam.

В группах хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Vic) и К–ЖГВ, после заражения штаммом линии V/Vic не наблюдалось повышения температуры тела ни на 30-1 день, ни на 31-й день эксперимента, по сравнению с интактной группой. Эти результаты показывают, что однократная иммунизация Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Vic) и К–ЖГВ эффективна против эпидемического вируса линии V/Vic. У хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Yam) после заражения эпидемическим вирусом линии V/Vic был зарегистрирован небольшой подъем температуры ($39,5^{\circ}\text{C}$), однако полученные данные не имели статистически значимых отличий по сравнению с контрольной группой 7 ($p=0,658$, группа 3 против группы 7). Инфицирование контрольных групп хорьков, вирусом гриппа дикого типа V/Yam не влияло на температуру тела, как на 29-й день эксперимента, так и в последующие дни, поэтому оценить защитный эффект Т– и К–ЖГВ против этого вируса по этому признаку не представлялось возможным.

Репликация вирусов в верхних и нижних дыхательных путях хорьков после инфицирования хорьков эпидемическими вирусами V/Vic и V/Yam

Вирус V/Yam не был обнаружен в носовых смывах и легких животных, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Yam) или К–ЖГВ. В группе хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Vic), неожиданно было обнаружено статистически значимое снижение репликации вируса гетерологичной линии V/Yam в носовых смывах по сравнению с контрольной группой вируса гетерологичной линии ($2,1 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$ против $3,6 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$, $p=0.0495$. Рис.6.4 а,б).

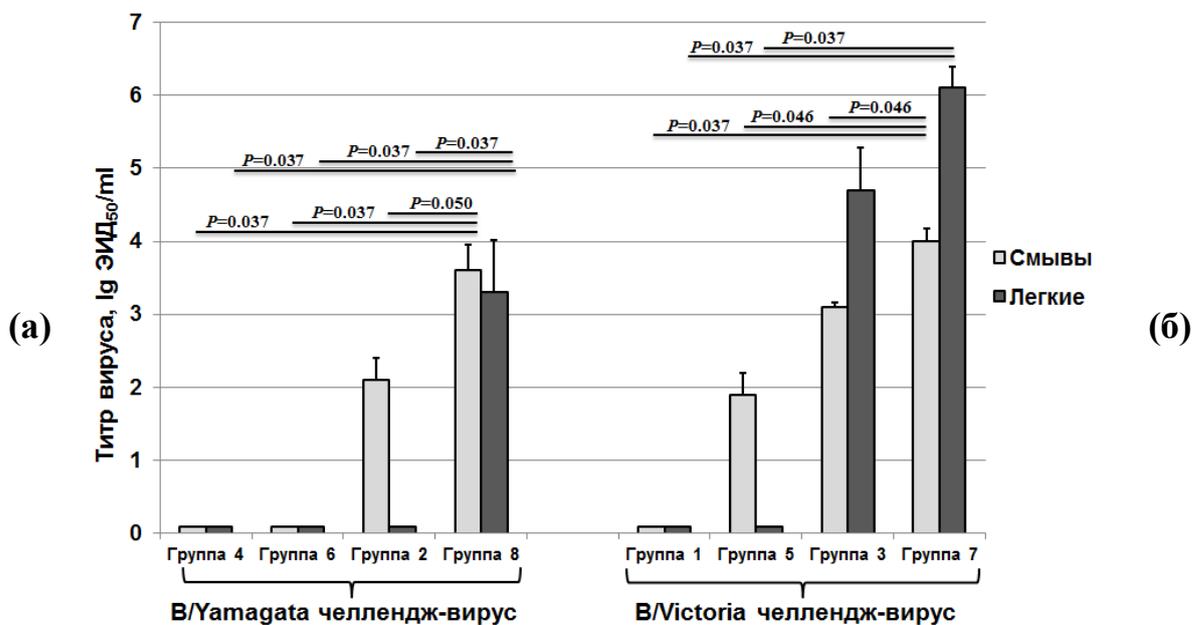


Рисунок 6.4 Интенсивность репликации челлендж–вируса в респираторном тракте хорьков, предварительно вакцинированных Т–ЖГВ или К–ЖГВ. Обозначения: (а) после инфицирования вирусом линии V/Yam; (б) после инфицирования вирусом линии V/Vic.

У животных иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic) или К-ЖГВ в легких не было обнаружено вируса гомологичной линии В/Vic. По результатам титрования носовых смывов хорьков иммунизированных К-ЖГВ было показано статистически значимое снижение репликации вируса В/Vic ($1,9 \lg$ ЭИД₅₀/мл) по сравнению с контрольной группой 7 ($4,0 \lg$ ЭИД₅₀/мл).

Как видно из рисунка 6.4, у хорьков иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) было зафиксировано снижение репликации вируса гетерологичной линии В/Vic в ВДП хорьков. Кроме того уровень репликации, был статистически значимым по сравнению с контрольной группой животных ($3,1 \lg$ ЭИД₅₀/мл против $4,0 \lg$ ЭИД₅₀/мл), однако, снижение репликации было не таким выраженным как в 1 группе животных. Что же касается Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) впоследствии зараженных гетерологичной инфекцией В/Vic, то защита в НДП была менее выражена, по сравнению группой хорьков иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic).

Таким образом, полученные данные показывают, что вакцинация Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) защищала хорьков от заражения гомологичным и гетерологичным челлендж-вирусом гриппа типа В. В частности, иммунизация хорьков привела к ингибированию как гомологичной, так и гетерологичной вирусной репликации в ВДП. Иммунизация Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic) проявляла более выраженный эффект на репликацию вируса гетерологичной инфекции в НДП, чем иммунизация Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam). Что касается Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam), то иммунизация ею хорьков с дальнейшим заражением гетерологичным вирусом В/Vic не давала статистически значимой защиты ($p=0,127$).

6.2.3 Оценка уровня гуморального иммунного ответа в сыворотках крови хорьков

Предварительный скрининг животных показал, что все хорьки были серонегативными. В частности, ни один из хорьков не имел титры антител $HA \leq 1:10$ до заражения вирусами В/Vic (линия В/Vic), В/Ph (линия В/Yam) и до иммунизации Т- и Ч-ЖГВ (табл.6.11).

Таблица 6.11 Иммунный ответ у хорьков на введение Т- и К-ЖГВ в челлендж-эксперименте

Препарат	Среднегеометрический титр антител в сыворотках крови, до и после иммунизации Д0 / Д28			
	Н1N1	Н3N2	В/Vic	В/Yam
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic)	5.0 / 452.5	5.0 / 201.6	5.0 / 35.6*	5.0 / 5.0
Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam)	5.0 / 806.3	5.0 / 127.0	5.0 / 5.0	5.0 / 31.7**
К-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam)	5.0 / 570.2	5.0 / 71.3	5.0 / 17.8	5.0 / 22.4

Обозначения: *Отличия между группами Т- или Ч-ЖГВ привитых животных не были статистически значимыми (t-критерий Стьюдента $t=1.18$, $P=0.06$). **Отличия между группами Т- или Ч-ЖГВ привитых животных не были статистически значимыми (t-критерий Стьюдента $t=0.96$, $P=0.50$).

Спустя 28 дней после вакцинации, у всех иммунизированных хорьков было зарегистрировано как минимум четырехкратное увеличение титров антигемагглютинирующих антител к гомологичным вирусам гриппа. В частности, самые высокие титры наблюдались для А компонента вакцины (H1N1pdm09: 452,5-806,3). Для компонента H3N2 вакцины было замечено меньшие титры антител (71,3-201,6). Самые низкие показатели титра антител регистрировали для В компонентов К-ЖГВ (17,8-35,6). Что же касается антигемагглютинирующих антител к гетерологичным вирусам гриппа В, у иммунизированных трехвалентными вакцинами хорьков не было обнаружено перекрестно реагирующих антител.

Таким образом, представленные выше результаты свидетельствуют о том, что однократная иммунизация как моно-, так и трехвалентной вакциной защищает от последующего заражения не только гомологичным, но и гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В. Однако, продемонстрированная перекрестная защита, скорее всего, связана с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом, поскольку перекрестно реагирующих антител к гетерологичному вирусу гриппа В (как линии В/Vic, так и В/Yam) в реакции РТГА обнаружено не было.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ

Грипп у человека вызывают вирусы гриппа типа А, В и С. Долгое время считалось, что основным пандемическим потенциалом обладает вирус гриппа А. Также полагали, что вирус гриппа В обладает более низкой скоростью антигенной эволюции и вызывает более легкое заболевание, по сравнению с вирусом гриппа А. Однако, появляется все больше работ, в которых отмечается недооцененность вируса гриппа В, связанная с меньшей информацией об эпидемиологии и особенностях его передачи. Имеются сведения не только о локальных, но и массовых вспышках вируса гриппа В [61, 92, 120, 125]. Кроме того, инфекция, вызванная вирусами гриппа В, вызывает сходные с гриппом А клинические симптомы вне зависимости от возраста инфицированных [53, 77, 172] и может привести к тяжелым осложнениям и смерти [62, 72, 105].

Не вызывает сомнений, что наиболее эффективным методом защиты от гриппозной инфекции является вакцинация [184]. Одной из наиболее восприимчивых групп населения к вирусной инфекции являются маленькие дети. За рубежом, в частности, в США, профилактические прививки живой гриппозной вакциной разрешены для детей с двух лет, а ИГВ – с шести месяцев. Что касается России, то вакцинация инактивированной вакциной начинается в шесть месяцев, а ЖГВ разрешена для всех детей в возрасте с трех лет и старше. Учитывая, что дети первого года жизни защищены пассивным материнским иммунитетом, можно было бы считать, что одна из самых уязвимых возрастных групп – дети 1–3 лет – надежно ограждена от гриппа инактивированной вакциной, однако, на самом деле ситуация сложнее. После первой иммунизации инактивированной вакциной шестимесячных серонегативных детей в результате феномена импринтинга последующий контакт с новым вирусом гриппа приведет к формированию антител, направленных не на него, а на общие у двух штаммов (вакцинного и нового эпидемического) переменные участки гемагглютинина [47, 169]. Поэтому вакцинация ИГВ не приведет к желаемому эффекту. Только живая вакцина способна имитировать естественную гриппозную инфекцию, формируя В- и Т-клетки памяти не только к переменным, как ИГВ, но и к консервативным участкам НА, что обеспечит эффективную защиту от вирусной инфекции [169].

Отсюда следует, что в самый первый раз дети должны встретиться с живым вакцинным вирусом, желательно – со всеми актуальными циркулирующими подтипами (H1N1, H3N2, В). Это обеспечит формирование иммунологической памяти к широкому спектру консервативных вирусных эпитопов. Такой сформировавшийся в первые годы жизни «иммунологический отпечаток» при последующей вакцинации или естественной инфекции активирует клетки иммунологической памяти, направленные на перекрестно-реагирующие эпитопы, обеспечивая

перекрестную защиту. Учтя все вышесказанное, специалисты WHO выразили беспокойство по поводу сложившейся ситуации, и в качестве пути решения этого вопроса обсуждают вопрос о необходимости снижения разрешенного возраста начала прививок живой гриппозной вакциной [186]. На данный момент, несмотря на важность эффективной защиты против гриппа детей в возрасте 1-3 лет, в России эта возрастная группа остаются неохваченной вакцинацией ЖГВ. Отчасти, это связано с отсутствием клинически испытанного и охарактеризованного донора аттенуации типа В для детской вакцины. Для подготовки штаммов детского варианта ЖГВ типа А существует донор А/Лен/47 [5], а для подготовки В-компонента ЖГВ для самых маленьких детей мог бы использоваться резервный донор аттенуации В14 [24], однако на сегодняшний день для возможности его клинического применения необходимы дополнительные исследования, поскольку работа с данным вирусом была приостановлена в 90-х годах. Методы, которыми изучался резервный донор В14 в советское время, на сегодняшний день считаются устаревшими и не дают исчерпывающей информации о его свойствах. Изучение донора В14 с современных позиций необходимо для разработки безопасных противогриппозных вакцин, применение которых возможно у самых маленьких детей.

В настоящем исследовании резервный донор аттенуации В14 был изучен современными вирусологическими и молекулярно-биологическими методами для подтверждения возможности его использования для защиты детей в возрасте 1-3 лет от гриппозной инфекции.

На первом этапе исследований потребовалось получение чистой популяции вируса В14 со стабильными биологическими и фенотипическими свойствами. Маркерами аттенуации вируса гриппа В являются неспособность к репликации при повышенной (37-38°C) и выраженная репликация при пониженной (25-26°C) температуре инкубации, так называемый *ts/ca* фенотип. Эти характеристики должны быть стабильными вне зависимости от числа проведенных пассажей. Поэтому так важно, чтобы донор аттенуации не содержал смесь клонов, обладающих разным набором мутаций и соответственно разными фенотипическими характеристиками и показателями иммуногенности.

При фенотипическом анализе отдельных клонов донора В14 была обнаружена существенная вариабельность результатов - при температуре инкубации 37°C их RCT_{37} колебалась от 3,0 до 6,5 $IgЭИД_{50}/мл$, что свидетельствовало о гетерогенности исходной популяции донора В14. Похожие данные были получены ранее Ларионовой Н.В. при фенотипическом анализе отдельных клонов базового донора аттенуации В60 [16]. Полногеномное секвенирование донора В14 подтвердило гетерогенность его популяции.

Теоретически при скрещивании гетерогенного донора с «диким» вирусом в геном реассортанта может перейти любой клон из популяции донора. При отборе перспективного клона резервного донора В14 мы опирались на опыт исследований 1980-х годов вакцинного штамма

В/14/28 [27], подготовленного в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» на основе эпидемического вируса В/СССР/3/87. При вакцинации этим штаммом у детей не было выявлено клинически выраженных реакций, но вырабатывался выраженный иммунный ответ; показатели сероконверсий были на высоком уровне (62,0% среди детей в возрасте 3-6 лет и 69,2% среди детей в возрасте 7-14 лет) [21]. Можно было полагать, что вакцинный штамм В/14/28 был подготовлен на клоне донора В14, удачно сочетавшем свойства безвредности и иммуногенности. Мы секвенировали вакцинный штамм В/14/28 и при отборе оптимального клона из популяции донора В14 опирались на последовательности внутренних генов этого штамма, зарекомендовавшего себя безвредным и иммуногенным для детей. Клонирование популяции В14 позволило выбрать клон, по фенотипическим свойствам, набору мутаций во внутренних генах и иммуногенности для животных идентичный вакцинному штамму В/14/28. Таким клоном оказался вариант В14/710, который использовался нами во всей дальнейшей работе.

Поиск уникальных аминокислотных замен в последовательности доноров аттенуации играет важную роль, поскольку показывает их уникальность и связь с аттенуацией. Выявление аминокислотных замен в геноме клонированного резервного донора В14 (клона В14/710) затруднялось отсутствием его эпидемического родителя, поэтому установление уникальности мутаций у вируса В14/710 проводилось путем его сравнения со штаммом В/14/28 и всеми доступными последовательностями вирусов гриппа В разных лет выделения (от 200 до 700 последовательностей для разных генов), представленными в базе данных Influenza Research Database (fludb.org). Как и во внутренних генах вакцинного штамма В/14/28, в PB2, PB1, PA и NP сегментах донора аттенуации В14/710 было обнаружено 17 уникальных аминокислотных замен. У ранее изученных доноров аттенуации количество аминокислотных замен было гораздо меньше (В60 – 7; В/АА – 9), что может свидетельствовать о большей аттенуированности резервного донора В14/710.

Ранее, при оценке безопасности и иммуногенности доноров аттенуации В60, В14 и реассортантов на их основе, Александровой с соавт. [1], было показано, что оба донора являются ареактогенными для детей и для взрослых. Что же касается иммуногенности, то донор В60 проявлял себя более иммуногенным для взрослых, иммуногенность донора В14 повышалась со снижением возраста привитых, что, скорее всего, также говорит о его большей аттенуации по сравнению с донором В60.

Для подтверждения более выраженного аттенуирующего фенотипа альтернативного донора В14/710 была проведена его сравнение с базовым донором В60. Была установлена большая температурочувствительность альтернативного донора В14/710 по сравнению с донором В60 (отличия были статистически значимы). Поскольку известно, что, свойство температурочувствительности вируса коррелирует с его аттенуацией [15], представлялось

целесообразным сравнить степень аттенуированности доноров В14/710 и В60 на лабораторных животных (мышях) путем определения активности их репродукции в легких на 1,3,5 и 7 сутки после интраназального введения.

Следует отметить, что наличие того или иного вируса гриппа в легочной ткани мышей еще не свидетельствует о его вирулентности. Известно, что аттенуированный вирус не должен проникать в НДП. Исключение составляют мыши, у которых даже ХА вирусы способны к репликации как в ВДП, так и в НДП. Однако, уровень репликации аттенуированных штаммов в легочной ткани мышей значительно ниже по сравнению с эпидемическими штаммами. При сравнении двух доноров аттенуации на мышинной модели также была продемонстрирована бóльшая аттенуированность альтернативного донора В14/710, которая проявлялась в более низком титре вируса в легких мышей.

Проведение процедуры клонирования дает гарантию чистой популяции штамма и неизменность показателей его фенотипа - и генотипа, однако не исключает возможности получения низкоиммуногенного клона [5]. Поэтому, после получения чистой популяции резервного донора В14 мы провели на модели мышей сравнительное изучение иммуногенности трех пар вакцинных реассортантов, подготовленных на основе трех диких вирусов и двух доноров аттенуации, В60 и В14/710. В данном эксперименте в качестве контроля использовали два изученных в 1980-х годах в наблюдениях на детях вакцинных штамма В/14/28 и В/60/3, подготовленных на одном «диком» родительском вирусе и двух донорах аттенуации [21].

Было показано, что однократная иммунизация мышей вакцинными штаммами как линии Виктория, так и линии Ямагата, подготовленными на основе клонированного донора В14 или В60, привела через 21 день после иммунизации к формированию выраженного гуморального ответа.

Таким образом, в результате нашей работы был отобран чистый клон донора В14, который являлся более аттенуированным, чем базовый донор В60, но не уступающим ему по показателям иммуногенности для лабораторных животных.

Важной характеристикой донора аттенуации является понимание механизмов его аттенуации, а именно - роли конкретных генов в проявлении температурочувствительности и аттенуированности самого донора и реассортантов-кандидатов в вакцинные штаммы, подготовленных на их основе. Работа такого рода проводится путем анализа фенотипических свойств большого числа разнообразных реассортантов между изучаемым донором и эпидемическими вирусами, а для этого необходим быстрый метод оценки состава генома реассортантов. На сегодняшний день определение состава генома реассортантов проводится методом секвенирования [152], который является точным, однако довольно длительным и затратным. Существует также оперативный и менее дорогой метод пиросеквенирования для

быстрого скрининга реассортантов, который до настоящего времени применялся только за рубежом и только для вирусов гриппа типа А [104, 164].

В настоящей работе мы модифицировали метод пиросеквенирования для быстрого скрининга реассортантов вируса гриппа типа В. Для генотипирования реассортантов вируса гриппа типа В нами был разработан протокол, основа которого заключалась в определении коротких, наиболее вариабельных участков нуклеотидной последовательности вирусов.

Данным методом за две недели было проанализировано более трехсот реассортантов, подготовленных на основе альтернативного донора В14/710 и официального – В60 и эпидемических вирусов: В/Mass, В/Ph, В/Br, В/Ind, в том числе вакцинные штаммы В/60/Phuket/2013/26; В/14/Brisbane/2008/54; В/14/Indiana/2015/81; В/14/Phuket/2013/74.

Одной из важных характеристик донора аттенуации является определение мутаций в его геноме, влияющих на аттенуацию, и понимание роли отдельных генов в аттенуации. У всех используемых в настоящее время доноров коммерческой ЖГВ установлена роль генов в проявлении температурочувствительности и аттенуации для животных [15, 16, 78, 82, 87, 94, 95]. У российских доноров аттенуации, И.В.Киселевой с соавт. в 2004 году была показана главная роль PB2 и PB1 генов в формировании аттенуации донора А/Лен/17 [94]; в 2010 году - PB2 и PA генов в аттенуации В60 донора [16, 95]. Что касается американских доноров аттенуации, Jin H. в 2003 году была показана ведущая роль PB2 и PB1 в проявлении аттенуации донора А/Ann Arbor/6/60 [87], а в 2005 году Hoffman показал роль PA, NP и М генов в аттенуации донора В/Ann Arbor/1/66 [78]. Из представленных данных можно сделать вывод о том, что в проявление аттенуированности вирусов могут быть вовлечены разные гены, но как правило, аттенуация доноров связана с уникальными кодирующими мутациями в генах полимеразного комплекса.

Выбор эпидемических вирусов для выяснения роли генов в аттенуации играет немаловажную роль. В нашей работе были использованы эпидемические температуроустойчивые вирусы гриппа В линии Виктория, линии Ямагата и вирус устаревшей антигенной структуры, циркулировавших до расхождения вирусов гриппа на две ветви - В/Lee/40 (до расхождения ветвей), В/Massachusetts/2/12 (линия Ямагата) и В/Indiana/25/15 (линия Виктория).

Для установления механизмов аттенуации донора В14/710 в данной работе было получено более 300 реассортантов с различным сочетанием генов от донора и эпидемических родителей. Поскольку аттенуация непосредственно связана со свойством температурочувствительности [15, 95], главным условием получения реассортантов было скрещивание температурочувствительного донора В14/710 с эпидемическими вирусами, имеющими альтернативный - температуроустойчивый фенотип.

Механизмы аттенуации можно изучать на реассортантах, полученных методами классической реассортации [94, 95], либо методами обратной генетики, что и проводилось для доноров А/Лен/17, А/Ann Arbor/6/60, В/Ann Arbor/1/66 [78, 82, 87]. В нашей работе исследование роли генов в аттенуации изучалось на модели одногенных и полигенных реассортантов, полученных методом классической реассортации. Для получения максимального разнообразия реассортантов скрещивание альтернативного донора В14/710 с эпидемическими вирусами проводилось в разных условиях, при различной температуре скрещивания (32°C, 37°C, 26°C), в присутствии антисыворотки к донору аттенуации и без нее.

Изучение *ts*-фенотипа полученных реассортантов показало, что для наследования признака температурочувствительности необходимо присутствие в геноме реассортантов гена PB2 от донора В14/710. Также сочетание генов PB2+PB1 от донора обеспечивало приобретение температурочувствительности реассортантов, а сочетание генов PB2+PA усиливало это свойство. В случае же отсутствия полимеразных генов от донора В14/710 фенотип реассортантов оставался температуроустойчивым. Необходимо отметить влияние гена NP от донора аттенуации В14/710 на фенотипические признаки реассортантов: все полученные варианты с сочетанием донорских генов PB2+PB1+PA+NP; PB2+PB1+NP; PB2+PA+NP и PB2+NP приобретали свойство температурочувствительности.

Несмотря на то, что именно это свойство обеспечивает аттенуацию, изучение безопасности тех или иных генов на модели животных является обязательным при изучении механизмов аттенуации. В нашей работе изучение роли генов в аттенуации оценивали на модели мышей. Полученные результаты показали, что безвредными для мышей оказались те реассортанты, которые унаследовали полимеразные гены от донора аттенуации, в частности обязательным условием было наличие гена PB2. Это совпадает с полученными данными о роли генов вируса В14/710 в формировании *ts* фенотипа реассортантов.

Ранее, Киселевой И.В. с соавт. [16, 95] было показано, что ген PB1 (как и ген NP) не участвуют в обеспечении аттенуации донора В60, поскольку не содержат мутаций. Что же касается резервного донора В14, то все четыре компонента его нуклеопротеинового комплекса (PB2, PB1, PA и NP) содержат уникальные аминокислотные замены. Поскольку было показано, что резервный донор В14/710 является более аттенуированным по сравнению с донором В60, представляло интерес изучить дополнительную роль генов NP-комплекса, мутантных у вируса В14/710 и не мутантных у В60. Можно было ожидать, что замена в геноме донора В14/710 мутантного PB1 и/или NP гена на немутантный ген от донора В60 приведет к некоторому снижению аттенуирующих свойств результирующего одногенного реассортанта. Однако, при скрещивании доноров В60 и В14/710 были получены неожиданные результаты.

Во-первых, несмотря на многочисленные попытки, нам удалось получить только реассортанты, одногенные по гену PB1, которые унаследовали 7 генов от B14/710 и один ген от донора B60 – PB1, несущий 2 уникальные кодирующие замены (75 а/к позиция Lys→Glu; 737 а/к позиция Gly→Asp). Изучение аттенуирующего фенотипа полученного одногенного реассортанта на модели мышей и его фенотипический анализ в системе *in ovo* показало, что, вопреки ожиданиям, полученный реассортант оказался не только более температурочувствительным, чем каждый из родительских штаммов, но и наиболее аттенуированным. Полученные данные свидетельствуют о том, что уникальные замены в PB1 гене резервного донора B14/710 могут являться сдерживающим фактом в его возможной гиператтенуации.

Таким образом, был подготовлен температурочувствительный холодадаптированный штамм B14/710, по своим биологическим характеристикам перспективный для использования в качестве резервного донора ЖГВ типа В для защиты от гриппа детей в возрасте 1-3 лет.

Вторым направлением нашей работы, также связанным с оптимизацией живой гриппозной вакцины, явилось изучение потенциала перекрестной защиты вакцинных препаратов, содержащих антигенно отличающиеся штаммы вирусов гриппа В. Одновременная циркуляция двух антигенно отличающихся линий вируса гриппа В – В/Victoria и В/Yamagata ставит вопрос о периодически случающемся несоответствии вакцинного и циркулирующего штаммов вируса гриппа В, если речь идет о трехвалентной гриппозной вакцине. Вакцинация квадριвалентной вакциной могла бы уберечь население от возможного несоответствия штаммов. В 2017 году была опубликована работа Харит с соавт. по оценке предотвращенных затрат при вакцинации три- и квадριвалентными ИГВ в разных возрастных группах [33]. Авторы высказали опасения о снижении эффективности вакцинации ИГВ при несовпадении циркулирующего и включенного в вакцину штамма вируса гриппа типа В и показали, что использование квадριвалентной ИГВ повышает эффективность вакцинации и увеличивает объем предотвращенных затрат. При этом наиболее эффективной замена трехвалентной на квадριвалентную вакцину может оказаться при вакцинации детей дошкольного и школьного возраста.

С другой стороны, производство квадριвалентной вакцины имеет целый ряд ограничений и сложностей, к которым относится удорожание процесса подготовки вакцины, удлинение сроков ее подготовки, повышение стоимости препарата и др. В настоящее время целый ряд стран, как развитых, так и развивающихся, продолжает использовать трехвалентную гриппозную вакцину. Сложившаяся ситуация поставила вопрос об изучении потенциала перекрестной защиты трехвалентных вакцин, содержащих антигенно отличающиеся штаммы вирусов гриппа В [37, 192].

В недавно опубликованном экспериментальном исследовании Laurie с соавт. изучали кросс-протективные свойства вирусов гриппа В, принадлежащих разным генетическим линиям (В/Vic и В/Yam) [102]. Хорьков инфицировали одним штаммом вируса гриппа В, а затем через разные промежутки времени (3,10 и 28 дней) коинфицировали штаммом гетерологичной генетической линии. Полученные результаты свидетельствовали о том, что вирусы гриппа В обеих линий могут предотвратить репликацию вируса гетерологичной линии [102].

В России к началу нашей работы подобные исследования не проводились. В этой связи интересно было изучить возможную защиту и эффективность отечественной ЖГВ против антигенно отличающихся штаммов вируса гриппа В. Поэтому вторая часть нашей работы предполагала, изучение защитного действия моновалентной и трехвалентной ЖГВ от гомологичных и гетерологичных вирусов гриппа типа В на модели хорьков.

На первом этапе нашего исследования оценивалась кросс-протективность моновалентной ЖГВ типа В из штаммов, принадлежащих к генетическим линиям В/Vic (В/Brisbane/60/08) и В/Yam (В/Phuket/3073/2013). Защитные свойства ЖГВ изучались путем оценки клинических симптомов (активность животных, температура, масса тела), репликации вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей и оценки гуморального иммунного ответа на вакцинацию.

При иммунизации моновалентной ЖГВ типа В у хорьков не было зарегистрировано каких-либо значимых клинических симптомов. На первый день опыта у животных всех групп, включая контрольных, отмечалось некоторое снижение активности, которое скорее всего было связано с введением наркоза и нормализовалось на следующий день.

После челленджа хорьков контрольных групп (не получавших ранее вакцину) отмечалось проявление типичных клинических симптомов заболевания, таких, как снижение активности, потеря аппетита, повышение температуры тела и чихание. Также о развитии заболевания свидетельствовало наличие вируса не только в верхних, но и НДП. Следует отметить, что у интактных хорьков (вторая контрольная группа) не было зарегистрировано каких-либо симптомов заболевания. Таким образом, в контрольных группах (контроль челлендж-вируса) была зарегистрирована четкая картина гриппозной инфекции при ее полном отсутствии у интактных животных.

После заражения челлендж-вирусами ранее иммунизированных животных, клинические проявления (масса тела, температура тела, активность) также не отличались от таковых у интактных животных и были близки к нормальному физиологическому состоянию. Репликация челлендж-вируса вируса в ВДП иммунизированных животных варьировала от 0,7 до 1,83 lg ЭИД₅₀/мл, тогда как в контрольных (В/Vic и В/Yam) группах составляла 5,53 (В/Vic) и 3,70 lg ЭИД₅₀/мл (В/Yam) соответственно.

Наиболее важным результатом, полученным в данном эксперименте, было доказательство того, что однократная иммунизация моновалентной ЖГВ не давала распространяться в НДП не только гомолочному, но и гетерологичному вирусу, о чем свидетельствовало и отсутствие выраженных клинических симптомов заболевания, и незначительное присутствие вируса в легочной ткани хорьков. Также, следует отметить, что при оценке гуморального иммунного ответа у хорьков был зарегистрирован прирост антител только к гомологичному вирусу.

Таким образом, продемонстрированная перекрестная защита моновалентной ЖГВ, скорее всего, связана с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом.

Получив в первом эксперименте обнадеживающие результаты, мы перешли к следующему этапу работы - изучению кросс-протективности трехвалентной ЖГВ. В данном эксперименте помимо стандартных контрольных групп животных: (1) полностью интактных животных; (2) зараженных только эпидемическими штаммами вируса гриппа В линии В/Vic и В/Yam, была добавлена еще одна контрольная группа – (3) животных иммунизированных квадριвалентной ЖГВ.

При оценке защитных свойств Т-ЖГВ (В/Vic и В/Yam), также было продемонстрировано некоторое определенное активности животных после вакцинации, однако поведение хорьков существенно не отличалось от интактных животных. Что касается репликации вируса в ВДП животных, то при титровании носовых смывов иммунизированных хорьков, титр вируса варьировал от 4,20 до 4,53 lg ЭИД₅₀/мл, что свидетельствовало о хорошей приживляемости вакцины.

Также следует отметить, что после заражения челлендж-вирусами линии В/Vic и В/Yam животных контрольных групп также, как и в первом эксперименте, было зарегистрировано выраженное проявление клинических симптомов заболевания, сопровождающееся снижением активности животных, потерей аппетита, а также чиханием и кашлем. Однако, что касается температуры тела, у контрольных животных, зараженных эпидемическим вирусом линии В/Yam, не было зафиксировано статистически значимого подъема температуры по сравнению с интактными и иммунизированными животными. Что касается репликации челлендж-вируса у контрольных животных, нужно отметить, что полученные данные были аналогичны данным эксперимента с моновакцинами, - вирус хорошо реплицировался как в носовых ходах, так и в легких животных.

После заражения челлендж-вирусами у животных, иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic) и К-ЖГВ в легких не было обнаружено присутствия челлендж-вируса. В носовых ходах хорьков, иммунизированных К-ЖГВ, было показано статистически значимое снижение репликации челлендж-вируса В/Vic по сравнению с контрольной группой животных. У хорьков, иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) в ВДП было зафиксировано снижение

репликации вируса гетерологичной линии В/Vic и полное отсутствие вируса гомологичной линии. Кроме того, уровень репликации гетерологичного вируса в ВДП хорьков, иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam), был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой животных (3,1 lg ЭИД₅₀/мл против 4,0 lgЭИД₅₀/мл). У хорьков, иммунизированных Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic), репликация гетерологичного челлендж-вируса В/Yam была также снижена по сравнению с контрольной группой животных, однако не была статистически значимой. Также важно отметить, что у хорьков, иммунизированных любой из трехвалентных вакцин - Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) и Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic), был отмечен как минимум четырехкратный прирост антигемагглютинирующих антител к гомологичным вирусам гриппа В и отсутствие антител к гетерологичным вирусам.

Таким образом, суммируя полученные данные по кросс-протективности ЖГВ, полученные на модели хорьков, можно сделать вывод о том, что однократная иммунизация как моно-, так и трехвалентной вакциной защищает от последующего заражения не только гомологичным, но и гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В. Продемонстрированная перекрестная защита, скорее всего, связана с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом, поскольку перекрестно реагирующих антител к гетерологичному вирусу гриппа В (как линии В/Vic, так и В/Yam) в реакции РТГА обнаружено не было.

РАЗДЕЛ III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были разработаны подходы к расширению возможностей применения современной живой гриппозной вакцины. Для достижения этой цели работа проводилась в двух основных направлениях:

(1). *Подготовка резервного донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В, более аттенуированного, чем используемый в настоящее время базовый донор аттенуации В/СССР/60/69.* Разработка этого направления позволит охватить вакцинацией самые широкие слои населения. В рамках этого направления подготовлен ХА вирус В14/710, который может являться перспективным донором внутренних генов для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте от одного года до трех лет. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что он обладает более выраженными показателями температурочувствительности и аттенуации, чем используемый в настоящее время в практике здравоохранения базовый донор В/СССР/60/69. Это может быть связано с тем, что в генах, кодирующие внутренние белки, обнаружено на 10 уникальных аминокислотных замен больше, чем у донора В/СССР/60/69. При этом иммуногенность реассортантов, полученных на основе ХА вируса В14/710 не уступала иммуногенности реассортантов, подготовленных на базовом доноре В/СССР/60/69. Также исследованы механизмы аттенуации ХА вируса В14/710 и установлена ведущая роль гена PB2 в формировании его аттенуирующих свойств; выявлена взаимодополняющая роль генов PB2 и PA в этом процессе. Показан дополнительный вклад генов PB1 и NP донора В14/710 в формировании температурочувствительного фенотипа.

(2). *Доказательство возможности применения трехвалентных живых гриппозных вакцин, несовпадающих в антигенном отношении с циркулирующими штаммами вируса гриппа В.* Работа в этом направлении сделает производство вакцин более лабильным и позволит защитить население от гриппозной инфекции даже в случае неполного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа типа В без увеличения антигенной нагрузки, связанной с включением дополнительного, четвертого вакцинного компонента в состав вакцины. В связи с участвовавшим несовпадением циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа В трехвалентная живая гриппозная вакцина, подготовленная на основе отечественных доноров аттенуации, была охарактеризована в экспериментах на хорьках с точки зрения ее потенциальной кросс-протективности. Было установлено, что однократная иммунизация как моно-, так и трехвалентной ЖГВ защищает от последующего заражения гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В. При этом вакцинация препаратом, содержащим вакцинный

штамм вируса гриппа В Викторианской линии, обеспечивала более выраженную защиту от челленджа вирусом линии Ямагата. Этот факт требует дальнейшего изучения и объяснения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

Диссертационная работа открывает реальные перспективы для разработки нового поколения живой гриппозной вакцины для защиты от гриппа В детей первых трех лет жизни. Необходимо проведение доклинических исследований и клинических наблюдений на детях в возрасте от одного года до трех лет живой гриппозной вакцины, подготовленной на основе альтернативного ХА донора аттенуации В/14/710. Перспективным представляется также дальнейшее углубленное изучение одногенного реассортанта В14–60, в предварительных экспериментах проявившего самый высокий аттенуирующий фенотип среди проанализированных ХА донорских вирусов.

ВЫВОДЫ

1. На основе холодоадаптированного вируса гриппа В/Ленинград/14/17/55 подготовлен штамм В14/710, перспективный для использования в качестве резервного донора ЖГВ типа В для защиты от гриппа детей в возрасте от одного года до трех лет.

2. Показано, что в системе *in vitro* и *in vivo* резервный донор В14/710 более аттенуирован, чем базовый донор В/СССР/60/69, содержит на 10 уникальных кодирующих замен в консервативных участках внутренних белков больше, но в экспериментах на мышах по иммуногенности не уступающий базовому донору.

3. Установлена ведущая роль PB2 и PA генов в формировании аттенуирующего донора В14/710. Показан дополнительный вклад генов PB1 и NP в аттенуацию донора В14/710.

4. Модифицирован метод пиросеквенирования для оперативной оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.

5. На модели хорьков продемонстрирована перекрестная протективность моно- и трехвалентной ЖГВ. При этом защита от гетерологичного вируса гриппа В была более выражена в случае вакцинации препаратом, содержащим штаммы Викторианской линии.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВДП	верхние дыхательные пути
B14	донор аттенуации В/Ленинград/14/17/55
B14/710	клонированный аттенуации В/Ленинград/14/17/55/710
B60	донор аттенуации В/СССР/60/69
ЖГВ	живая гриппозная вакцина
ИГВ	инактивированная гриппозная вакцина
К-ЖГВ	квадривалентная живая гриппозная вакцина
НДП	нижние дыхательные пути
ПЦР	полимеразно цепная реакция (polymerase chain reaction)
РКЭ	развивающиеся куриные эмбрионы
РГА	реакция гемагглютинации
РТГА	реакция торможения гемагглютинации
Т-ЖГВ	трехвалентная живая гриппозная вакцина
ХА	холодоадаптированный
ЭИД ₅₀	50%–ная эмбриональная инфицирующая доза вируса
<i>att</i>	аттенуация, аттенуирующий фенотип (attenuation)
<i>ca</i>	холодоадаптированность (cold–adaptation, <i>ca</i> фенотип)
CDC	Центр по контролю и предупреждению заболеваемости (Centers for Disease Control and Prevention)
HEF	hemagglutinin-esterase-fusion
<i>non-ts</i>	способность к репродукции при температуре выше оптимальной
RNP	рибонуклеопротеиновый комплекс (ribonucleoprotein)
RCT ₄₀₍₃₇₎	репродуктивная способность при различных температурах (reproductive capacity at different temperatures)
RDE	receptor–destroying enzyme
SPF	specific pathogen–free eggs, куриные эмбрионы, свободные от специфической патогенной флоры
<i>ts</i>	температурочувствительность (temperature sensitivity)
WHO	Всемирная организация здравоохранения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Г.И. Итоги изучения специализированного варианта живой гриппозной вакцины для иммунизации детей дошкольного и младшего школьного возраста / Г.И. Александрова, Б.А. Микуцкая, Е.А. Сиротенко, Р.А. Плешанова, Р.П. Шапошникова // Вестник АМН СССР. – 1968. – (9). – С. 41–45.
2. Александрова, Г.И. Этиология, иммунология и специфическая профилактика гриппа (разработка) живой вакцины против гриппа для детей: дисс. ... докт. мед. наук: 03.00.06 / Александрова Галина Ибрагимовна. – Л., 1969. – 419 с.
3. Александрова, Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа / Г.И. Александрова // Вопросы вирусологии. – 1977. – 4. – С. 387–395.
4. Александрова, Г.И. Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций / Г.И. Александрова. – Л.: Медицина, 1986. – 90-100 с.
5. Александрова, Г.И. Живая вакцина против гриппа / Г.И. Александрова, А.И. Климов. – Спб.: Наука, 1994. – 151 с.
6. Александрова, Г.И. Живая гриппозная вакцина из термочувствительных рекомбинантов / Г.И. Александрова, Т.Е. Медведева, Ф.И. Полежаев // Вопросы Вирусологии. – 1984. – 4. – С. 411–414.
7. Гендон, Ю.З. Новые холодадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа / Ю.З. Гендон, С.Г. Маркушин, Т.М. Цфасман, И.И. Аكوпова, Н.К. Ахматова, И.Б. Коптяева // Вопросы Вирусологии. – 2013. – 1(58). – С. 11–17.
8. Гольдфарб, В.Э. Опыт подготовки аттенуированных вакцинных штаммов вируса гриппа для активной иммунизации детей младшего школьного и дошкольного возраста: дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06 / Гольдфарб Вольф Эмилевич. – Л., 1972. – 215 с.
9. Гольдфарб, В.Э. Ускорение процесса аттенуации вируса гриппа в условиях пассажиров при пониженной температуре в присутствии гидрокортизона / В.Э. Гольдфарб, Т.Е. Медведева // Проблемы гриппа и острых респираторных заболеваний. – 1975. – С.74-78.
10. Григорьева, Е.П. Сравнительная оценка безвредности, иммуногенной активности и профилактической эффективности взрослого и детского вариантов живой гриппозной вакцины у школьников 7-14 лет / Е.П. Григорьева, Ю.А. Дешева, С.А. Донина, А.Н. Найхин, А.Р. Рекстин и др. // Вопросы вирусологии. – 2002. – 2 (47). – С. 24–27.
11. Григорьева, Е.П. Вакцинопрофилактика гриппа с помощью живой гриппозной вакцины // Е.П. Григорьева, Е.М. Дорошенко, Л.Г. Руденко / Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2005. – 23. – С. 13–17.
12. Дешева, Ю.А. Изучение безвредности, генетической стабильности и иммуногенности живой гриппозной вакцины для взрослых при вакцинации детей до 3-6 лет / Ю.А. Дешева, Г.В. Данини, Е.П. Григорьева, С.А. Донина, И.В. Киселева и др. // Вопросы вирусологии. – 2002. – 4(47). – С. 21–24.
13. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза: по охране животных используемых в научных целях: Спб., 2010. – 48 с.

14. Егоров, А.Ю. Особенности получения и характеристика холодоадаптированного варианта вируса гриппа А/PR/8/34 1984 / Ю.А. Егоров, Т.Е. Медведева, Ф.И. Полежаев // *Acta virol.* – 1(28). – С. 19–25.
15. Киселева, И.В. Основы аттенуации вируса гриппа: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06 / Киселева Ирина Васильевна. – СПб., 2001. – 224 с.
16. Ларионова, Н.В. Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте: дис. ... д-ра биол. наук: 03.06.06 / Ларионова Наталья Валентиновна. – СПб., – 2017. – 336 с.
17. Маркушин, С.Г. Механизмы аттенуации холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) / С.Г. Маркушин, О.А. Свитич, А.Р. Кинкулькина, И.Б. Коптяева, К.В. Лисовская // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2016. – 2. – С. 49–56.
18. Медведева, Т.Е. Аттенуированный рекомбинант вируса гриппа типа В, полученный при скрещивании В/Энн Арбор/2/86 с холодоадаптированным штаммом В/Ленинград/14/17/55 / Т.Е. Медведева, А.Ю. Егоров, А.И. Климов и др. // *Вопросы вирусологии.* – 1989. – 5. – С. 564–568.
19. МУ 3.3.2.1758-03. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003).
20. Неведомская, Г.Н. Оценка степени аттенуации холодоадаптированных штаммов вируса гриппа А на моделях мышей линии СВА и сирийских хомячков / Г.Н. Неведомская, Т.Е. Медведева, И.В. Жихарева, А.И. Климов, Г.И. Александрова // *Вопросы вирусологии.* – 1992. – 37 (1). – С. 37- 40.
21. Отчет о НИР: Живая рекомбинатная гриппозная вакцины для детей из современных разновидностей вирусов гриппа А и В / Александрова Г.И. – СПб. – 1990. – 70 с.
22. Патент 2422517 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Брисбен/08/83 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №20102912; заявл. 28.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
23. Патент 2605926 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Пхукет/2013/26 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / И.В. Киселева, Е.В. Крутикова, И.А. Дубровина и др.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №2015122376/10; заявл. 09.06.2015; опубл. 27.12.2016, Бюл. № 36.
24. Патент 2068271 РФ, МПК А61К. Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа В/Ленинград/14/17/55 для получения штаммов живой гриппозной вакцины [Текст] / Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №92006474/14; заяв. 16.11.1992; опубл. 27.10.1996.
25. Патент 92006476 РФ, МПК А61К. Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа В/СССР/69/Е для получения штаммов живой интраназальной гриппозной вакцины [Текст] / Г.И. Александрова, А.Ю. Егоров; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №92006476/13; заяв. 16.11.1992; опубл. 20.05.1995.
2626. Патент 1731811 СССР, С12N 7/00. Штамм В/60/32 Р вируса гриппа В, используемый для получения живой интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / Т.А. Ермаченко, К.В.

Лисовская, Е.П. Грирогьева и др.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №4841460/13; заяв. 10.07.1990; опубл. 07.05.1992, Бюл. № 17.

27. Патент 2008351 РФ, МПК C12N. Штамм вируса гриппа В/14/28 Р для получения живой интраназальной гриппозной вакцины для детей [Текст] / Т.А. Ермаченко, Г.М. Водейко, К.В. Лисовская и др.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – №491354182/; заяв. 27.06.1991; опубл. 28.02.1994.

28. Полежаев, Ф. И. Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций / Ф.И. Полежаев, А.А. Гаврилов, Г.Н. Будиловский. – Ленинград: Медицина, 1986. – 109–116 с.

29. Приказ № 708н Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 "Об утверждении правил лабораторной практики". – 2010.

30. Сковородка, В.В. Роль отдельных генов в проявлении патогенности вируса гриппа / В.В. Сковородка, В.В. Фарошян, В.Я. Подчерняева, В.М. Жданов // Вопросы вирусологии. – 1983. – 6. – С. 719–722.

31. Смородинцев, А.А. Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей / А.А. Смородинцев. – Ленинград: Медицина, 1971. – 248 с.

32. Смородинцев, А.А. Грипп и его профилактика: руководство для врачей / А.А. Смородинцев. – Москва: Медицина, 1984. – 383 с.

33. Харит, С.М. Предотвращенный ущерб при вакцинации против гриппа 3- и 4-валентными вакцинами / С.М. Харит, А.В. Рудакова, А.Н. Усков и др. // Журнал инфектологии. – 2017. – 2(9). – С. 17–22.

34. Цыбалова, Л.М. Характеристика холодаадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности / Л.М. Цыбалова, Н.Е. Горев, М.В. Потапчук и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – 6 (57). – С. 13–17.

35. Alexandrova, G.I. Laboratory properties of cold-adapted influenza B live vaccine strains developed in the US and USSR, and their B/Ann Arbor/1/86 cold-adapted reassortant vaccine candidates / G.I. Alexandrova, H.F. Massab, A.P. Kendaal et al. // Vaccine. – 1990. – 1(8). – P. 61–64.

36. Al-Molish, M.I. The kinetics of the DEAE-dextran-induced cell sensitization to transfection / M.I. Al-Molish, G.R. Dubes // J. Gen. Virol. – 1973. – 18. – P. 189–193.

37. Asahi-Ozaki, Y. Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus / Y. Asahi-Ozaki, T. Yoshikawa, Y. Iwakura, et al. // Journal of Medical Virology. – 2004. – 2(74). – P. 328–335.

38. Audsley, J. Alternative approaches in the preparation and growth of influenza B vaccine viruses: Doc. ... of Philosophy / Jennifer M. Audsley. – School of Applied Sciences Science, Engineering and Technology Portfolio RMIT University, – 2007. – 229 p.

39. Auladell, M. Recalling the Future: Immunological Memory Toward Unpredictable Influenza Viruses / M. Auladell, J. Xiachao, L. Hensen, et al. // Frontiers in Immunology. – 2019. – 10. – P. 1400.

40. Baas, T. Integrated Molecular Signature of Disease: Analysis of Influenza Virus-Infected Macaques through Functional Genomics and Proteomics / T. Baas, C. Baskin, D. Diamond et al. // Journal of Virology. – 2006. – 21(80). – P. 10813–10828.

41. Baker, D.G. Natural Pathogens of Laboratory Animals: Their Effects on Research / D. Baker, G. David // ASM Press. – 2003. – 408 p.
42. Barr, I.G. The coming era of quadrivalent human influenza vaccines: who will benefit / I. Barr, L. Jelley // *Drugs*. – 2012. – 17(72). – P. 2177–2185.
43. Beare, A. S. Selection of influenza B virus recombinants and their testing in humans for attenuation and immunogenicity / A. Beare, J. Sherwood, K. Callow, J. Craig // *Infect Immun*. – 1997. – 2(15). – P. 347–353.
44. Belser, J.A. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses / J. Belser, K. Szretter, J. Katz, T. Tumpey // *Adv. Virus Res*. – 2009. – 73. – P. 55–97.
45. Belshe, R. B. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection / R. Belshe, M. Smith, C. Hall et al. // *J. Virol*. – 1988. – 2(65). – P. 1508–1512.
46. Bouvier, N.M. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission / N. Bouvier, A. Lowen // *Viruses*. – 2010. – 8(2). – P. 1530–1563.
47. Butler, D. The ghost of influenza past and the hunt for a universal vaccine / D. Butler // *Nature*. – 2018. – 7717(560). – P. 158–160.
48. CDC. Children the Flu and the Flu Vaccine [Электронный ресурс] // Seasonal Influenza. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/flu/protect/children.htm>
49. CDC. Influenza including seasonal, avian, swine, pandemic, and other [Электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/flu/index.htm>.
50. CDC. Types of Influenza Viruses [электронный ресурс] // Centers for Disease Control and Prevention. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
51. Chen, Z. Genetic mapping of the cold-adapted phenotype of B/Ann Arbor/1/66, the master donor virus for live attenuated influenza vaccines (FluMist) / Z. Chen, A. Aspelund, G. Kemble, H. Jin // *Virology*. – 2006. – 2(345). – P. 416–423.
52. Chen, Z. Molecular studies of temperature-sensitive replication of the cold-adapted B/Ann Arbor/1/66, the master donor virus for live attenuated influenza FluMist vaccines / Z. Chen, A. Aspelund, G. Kemble, H. Jin // *Virology*. – 2008. – 2(380). – P. 354–362.
53. Chi, C-Y. Clinical features of children infected with different strains of influenza B in southern Taiwan / C-Y. Chi, S-M. Wang, H-C. Wang, J-R. Wang et al. // *The pediatric infectious disease journal*. – 2008. – 7(27). – P. 640–645.
54. Cillóniz, C. Lethal Influenza Virus Infection in Macaques Is Associated with Early Dysregulation of Inflammatory Related Genes / C. Cillóniz, K. Shinya, X. Peng, et al. // *PLoS Pathogens*. – 2009. – 10(5). – e1000604.
55. Collin, E. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle / E. Collin, Z. Sheng, Y. Lang, et al. // *Journal of Virology*. – 2015. – 2(89). – P. 1036–1042.
56. Connor, R. Receptor Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates / R. Connor, Y. Kawaoka, R. Webster, J. Paulson // *Virology*. – 1994. – 205. – P. 17–23.

57. Couturier, B. Oseltamivir-resistant influenza A 2009 H1N1 virus in immunocompromised patients / B. Couturier, J. Bender, M. Schwarz, et al. // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2010. – 4(4). – P. 199–204.
58. Cox, R. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines / R. Cox, K. Brokstad, P. Ogra // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2004. – 1(59). – P. 1–15.
59. Dybing, J.K. [и др.]. Distinct pathogenesis of hong kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses // *J. Virol*. 2000. (74). C. 1143–1450.
60. Eichelberger, M. Influenza-induced tachypnea is prevented in immune cotton rats, but cannot be treated with an anti-inflammatory steroid or a neuraminidase inhibitor / M. Eichelberger, G. Prince, M. Ottolini // *Virology*. – 2004. – 2(322). – P. 300–307.
61. Fernandes, E. Influenza B outbreak on a cruise ship off the São Paulo Coast, Brazil / E. Fernandes, P. de Souza, M. de Oliveira, et al. // *Journal of Travel Medicine*. – 2014. – 5(21). – P. 298–303.
62. Finelli, L. Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of *Staphylococcus aureus* coinfection / L. Finelli, A. Fiore, R. Dhara, et al. // *Pediatrics*. – 2008. – 4(122). – P. 805–811.
63. Francis, T. Transmission of Influenza by a Filterable Virus / T. Francis // *Science*. – 1934. – 80. – P. 457–459.
64. Francis, T. A New Type of Virus from Epidemic Influenza / T. Francis // *Science*. – 1940. – 2392(92). – P. 405–408.
65. Francis, T. Immunological Studies with the Virus of Influenza / T. Francis, T. Magill // *J. Exp. Med*. – 1935. – 62. – P. 505–516.
66. Gabor, K. Influenza A virus infection in zebrafish recapitulates mammalian infection and sensitivity to anti-influenza drug treatment / K. Gabor, M. Goody, W. Mowel, et al. // *Disease Models & Mechanisms*. – 2014. – 11(7). – P. 1227–1237.
67. Garigliany, M-M. Influenza A Strain-Dependent Pathogenesis in Fatal H1N1 and H5N1 Subtype Infections of Mice / M-M. Garigliany, A. Habyarimana, B. Lambrecht et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – 4(16). – P. 595–603.
68. Ghendon, Y. Development of cell culture (MDCK) live cold-adapted (CA) attenuated influenza vaccine / Y. Ghendon, S. Markushin, I. Akopova, et al. // *Vaccine*. – 2005. – 38(23). – P. 4678–4684.
69. Glaser, L. Effective replication of human influenza viruses in mice lacking a major $\alpha 2,6$ sialyltransferase / L. Glaser, G. Conenello, J. Paulson, P. Palese // *Virus Research*. – 2007. – 1(126). – P. 9–18.
70. Glezen, W. Influenza virus infections in infants / W. Glezen, L. Taber, A. Frank et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1997. – 11(16). – P. 1065–1068.
71. Gorman, O. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus / O. Gorman, W. Bean, Y. Kawaoka, R. Webster // *Journal of virology*. – 1990. – 4(64). – P. 1487–1497.
72. Gutiérrez-Pizarra, A. Unexpected severity of cases of influenza B infection in patients that required hospitalization during the first postpandemic wave / A. Gutiérrez-Pizarra, P. Pérez-Romero, R. Alvarez, et al. // *The Journal of Infection*. – 2012. – 5(65). – P. 423–430.

73. He, J. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin / J. He, M. Bose, E. Beck, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – 9(47). – P. 2772–2778.
74. He, W. Molecular basis of live-attenuated influenza virus / W. He, W. Wang, H. Han, et al. // *PloS One*. – 2013. – 3(8). – e60413.
75. Heikkinen, T. Influenza vaccination in the prevention of acute otitis media in children / T. Heikkinen, O. Ruuskanen, M. Waris, et al. // *American Journal of Diseases of Children (1960)*. – 1991. – 4(145). – P. 445–448.
76. Heikkinen, T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999–2012 / T. Heikkinen, N. Ikonen, T. Ziegler // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2014. – 11(59). – P. 1519–1524.
77. Hite, L. Medically attended pediatric influenza during the resurgence of the Victoria lineage of influenza B virus / L. Hite, W. Glezen, G. Demmler, F. Munoz // *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. – 2007. – 1(11). – P. 40–47.
78. Hoffmann, E. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66 / E. Hoffmann, K. Mahmood, Z. Chen, et al. // *Journal of Virology*. – 2005. – 17(79). – P. 11014–11021.
79. Huang, Q. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin / Q. Huang Q. et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2003. – 1614(1). – P. 3–13.
80. Huang, S. Comparative analyses of pandemic H1N1 and seasonal H1N1, H3N2, and influenza B infections depict distinct clinical pictures in ferrets / S. Huang, D. Banner, Y. Fang et al. // *PloS One*. – 2011. – 11(6). – e27512.
81. Ibricevic, A. Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells / A. Ibricevic, A. Pekosz, M. Walter, et al. // *Journal of Virology*. – 2006. – 15(80). – P. 7469–7480.
82. Isakova-Sivak, I. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) / I. Isakova-Sivak, L-M. Chen, Y. Matsuoka, et al. // *Virology*. – 2011. – 2(412). – P. 297–305.
83. Itoh, Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses / Y. Itoh et al. // *Nature*. – 2009.
84. Jang, Y. Cross-protective immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines / Y. Jang Y, B. Seong // *Yonsei Medical Journal*. – 2013. – 2(54). P. 271–282.
85. Jefferson, T. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review / T. Jeffefson at al. // *The Lancet*. – 2006. – 367. – P. 303–313.
86. Jia, N. Glycomic Characterization of Respiratory Tract Tissues of Ferrets: implications for its use in influenza virus infection studies / N. Jia, W. Barclay, K. Roberts, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. –2014. – 41(289). – P. 28489–28504.

87. Jin, H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / H. Jia, B. Lu, H. Zhou, et al. // *Virology*. – 2003. – 1(306). – P. 18–24.
88. Jin, H. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / H. Jin, H. Zhou, B. Lu, et al. // *Journal of Virology*. – 2004. – 2(78). – P. 995–998.
89. Johnson, P. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted vaccine, and inactivated vaccine / P. Johnson, S. Feldman, J. Thompson, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1986. – 1(154). – P. 121–127.
90. Kadam, R. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol / R. Kadam, I. Wilson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – 2(114). – P. 206–214.
91. Katinger, H. Live influenza vaccine and method of manufacture / H. Katinger, A. Egorov, B. Ferko, et al. // 2002.
92. Khan, U. An outbreak of influenza B in an isolated nomadic community in Jammu & Kashmir, India / U. Khan, M. Mir, F. Ahmad, et al. // *The Indian Journal of Medical Research*. – 2013. – 6(138). – P. 1012–1015.
93. Kiseleva, I. Cell-based assay for the determination of temperature sensitive and cold adapted phenotypes of influenza viruses / I. Kiseleva, Q. Su, T. Toner, et al. // *Journal of Virological Methods*. – 2004. – 1(116). – P. 71–78.
94. Kiseleva, I. Role of individual genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) cold-adapted donor strain in manifestation of the temperature-sensitive phenotype of reassortant influenza A viruses / I. Kiseleva, A. Klimov, Q. Su, et al. // *International Congress Series*. – 2004. – 1263. – P. 547–550.
95. Kiseleva, I. PB2 and PA genes control the expression of the temperature sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus / I. Kiseleva, J. Voeten, L. Teley et al. // *Journal of General Virology*. – 2010. – 91. – P. 931–937.
96. Kiseleva, I. Restriction analysis of genome composition of live influenza vaccine / I. Kiseleva, N. Larionova, L. Teley, L. Rudenko // *Voprosy Virusologii*. – 2011. – 3(56). – P. 28–32.
97. Kiso, M. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study / M. Kiso, K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa, et al. // *The Lancet*. – 2004. – 364. – P. 759–765.
98. Klimov, A. Live attenuated reassortant influenza vaccine prepared using A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) donor strain is genetically stable after replication in children 3-6 years of age / A. Klimov, I. Kiseleva, J. Desheva et al. // *International Congress Series*. – 2001. – 1219. – P. 951–954.
99. Klimov, A. PCR restriction analysis of genome composition and stability of cold-adapted reassortant live influenza vaccines / A. Klimov, N. Cox // *Journal of Virological Methods*. – 1995. – 1–2(52). – P. 41–49.
100. Kobasa, D. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus / D. Kobasa, A. Takada, K. Shinya, et al. // *Nature*. – 2004. – 431. – P. 703–707.
101. Kobasa, D. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus / D. Kobasa, S. Jones, K. Shinya, et al. // *Nature*. – 2007. – 445(445). – P. 319–323.

102. Laurie, K. Evidence for viral interference and cross-reactive protective immunity between influenza B virus lineages / K. Laurie, W. Horman, L. Carolan, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. 2018. № 4 (217). P. 548–559.
103. Lee, K-H. Characterization of live influenza vaccine donor strain derived from cold-adaptation of X-31 virus / K-H. Lee, S-U. Seo, J-M. Song, et al. // *Vaccine*. – 2006. – 11(24). – P. 1966–1974.
104. Levine, M. Detection of hemagglutinin variants of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 Virus by Pyrosequencing / M. Levine, T. Sheu, L. Gubareva, V. Mishin // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – 4(49). – P. 1307–1312.
105. Lin, C-H. Neurologic manifestations in children with influenza B virus infection / C-H. Lin, Y-C. Huang, C-H. Chiu, et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2006. – 11(25). – P. 1081–1083.
106. Lindstrom, S. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes / S. Lindstrom, Y. Hiromoto, H. Nishimura, et al. // *Journal of Virology*. – 1999. – 5(73). – P. 4413–4426.
107. Liu, C. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding / C. Liu, M. Eichelberger, R. Compans, G. Air // *J Virol*. – 1995. – 69(2). – P. 1099–1106.
108. Lobmann, M. Recombinants of influenza virus type B as potential live vaccine candidates: RNA characterization and evaluation in man / M. Lobmann, A. Delem, D. Jovanovic, J. Peetermans // *J Hyg (Lond)*. – 1981. – (87). – P. 43–52.
109. Louise, H. A Novel Nonhuman Primate Model for Influenza Transmission / H. Louis, M. Ted, M. Jorge, et al. // *Plos One*. – 2013. – 11(8). – e78750.
110. Lowen, A. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses / A. Lowen, S. Mubareka, T. Tumpey, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – (103). – P. 9988–9992.
111. Lu, X. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans / X. Lu, T. Tumpey, T. Morken, et al. // *Journal of virology*. – 1999. – 7(73). – P. 5903–5911.
112. Maher, J. The ferret: an animal model to study influenza virus / J. Maher, J. DeStefano // *Lab Animal*. – 2004. – 9(33). – P. 50–53.
113. Mahmud, M. Influenza virus infection of a newborn rats: virulence of recombinant strains prepared from a cold-adapted, attenuated parent / M. Mahmud, H. Maassab, R. Jennings, C. Potter // *Arch. Virol*. – 1979. – 3(61). – P. 207–216.
114. Maines, T. Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals / T. Maines, X. Lu, S. Erb, et al. // *Journal of Virology*. – 2005. – 18(79). – P. 11788–11800.
115. Marshall, N. Influenza Virus Reassortment Occurs with High Frequency in the Absence of Segment Mismatch / N. Marshall, L. Priyamvada, Z. Ende, et al. // *PLoS Pathogens*. – 2013. – 6(9). – e1003421.
116. Matsuoka, Y. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle / Y. Matsuoka, H. Matsumae, M. Katoh et al. // *BMC Systems Biology*. – 2013. – 1(7). – P. 97.

117. Matsuzaki, Y. Frequent Reassortment among Influenza C Viruses / Y. Matsuzaki, K. Mizuta, K. Sugawara, et al. // *Journal of Virology*. – 2003. – 2(77). – P. 871–881.
118. Matsuzaki, Y. Genetic Lineage and Reassortment of Influenza C Viruses Circulating between 1947 and 2014 / Y. Matsuzaki, K. Sugawara, Y. Furuse, et al. // *Journal of Virology*. – 2016. – 18(90). – P. 8251–8265.
119. Matyushenko, V. Genotyping assay for differentiation of wild-type and vaccine viruses in subjects immunized with live attenuated influenza vaccine / V. Matyushenko, I. Isakova-Sivak, T. Smolonogina, et al. // *PloS One*. – 2017. – 7(12). – e0180497.
120. McCann, L. Descriptive epidemiology of school outbreaks of seasonal influenza B during 2012/2013 in the Thames Valley, United Kingdom / L. McCann, O. Suchanek, N. McCarthy, T. Mannes // *Public Health*. – 2014. – 12(128). – P. 1121–1124.
121. McCuller, J. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature / J. McCuller, G-C. Wang, S. He, R. Webster // *J. Virol.* – 1999. – 9(73). – P. 7343–7348.
122. Meanwell, N. Taking aim at a moving target - inhibitors of influenza virus. Part 1: virus adsorption, entry and uncoating / N. Meanwell, M. Krystal. // *Drug Discovery Today*. – 1996. – 8. – P. 316–324.
123. Mills, J. Evaluation of influenza virus mutants for possible use in a live virus vaccine / J. Mills, V. Kirk, D. Hill, R. Chanock // *Bull World Health Organ*. 1969. № 3 (41). P. 599–606.
124. Mills J., Chanock V., Chanock R. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. I. Behavior in tissue culture and in experimental animals // *J. Infect. Dis.* – 1971. – 123. – P. 145–157.
125. Moa, A. Epidemiology of influenza B in Australia: 2001-2014 influenza seasons / A. Moa, D. Muscatello, R. Turner et al. // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2017. – 2(11). P. 102–109.
126. Monto, A. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved / A. Monto, K. Sullivan // *Epidemiology and Infection*. – 1993. – 1(110). – P. 145–160.
127. Muraki, Y. The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus / Y. Muraki, S. Hong // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – 3(63). – P. 157–165.
128. Murphy, B. Genetic variation among influenza viruses / B. Murphy, R. Chanok // Ed. D. P. Nayak. New York. – 1981. – P. 601–615.
129. Neumann, G. The first influenza pandemic of the new millennium: 2009 H1N1 Influenza Pandemic / G. Neumann, Y. Kawaoka // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2011. – 3 (5). – P. 157–166.
130. Neumann, G. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus / G. Neumann, T. Noda, Y. Kawaoka // *Nature*. – 2009. – 7249(459). – P. 931–939.
131. Nicholson, K. Infectivity and reactogenicity of reassortant cold-adapted influenza A/Korea/1/82 vaccines obtained from the USA and USSR / K. Nicholson, D. Tyrrell, J. Oxford // *Bulletin of the WHO*. – 1987. – 3(65). – P. 295–301.
132. Nyrén, P. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis / P. Nyrén, A. Lundin // *Analytical Biochemistry*. – 1985. – 2(151). – P. 504–509.

133. Obrosova-Serova, N. Evaluation in children of cold-adapted influenza B live attenuated intranasal vaccine prepared by reassortment between wild-type B/Ann Arbor/I/86 and cold-adapted B/Leningrad/14/55 viruses / N. Obrosova-Serova, A. Slepushkin, A. Kendal, et al. // *Vaccine*. – 1990. – 8. – P. 57–60.
134. Oh, D-Y. Selection of multi-drug resistant influenza A and B viruses under zanamivir pressure and their replication fitness in ferrets / D-Y. Oh, J. Panozzo, S. Vitesnik, et al. // *Antiviral Therapy*. – 2017.
135. Ohishi, K. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phocacaspica*) / K. Ohishi, A. Ninomiya, H. Kida, et al. // *Microbiol Immunol*. – 2002. – 9(46). – P. 439–444.
136. Ortiz, J. Safety of Russian-backbone seasonal trivalent, live-attenuated influenza vaccine in a phase II randomized placebo-controlled clinical trial among children in urban Bangladesh / J. Ortiz, D. Goswami, K. Lewis, et al. // *Vaccine*. – 2015. – 29(33). – P. 3415–3421.
137. Osterhaus, A. Influenza B virus in seals / A. Osterhaus, G. Rimmelzwaan, B. Martina, et al. // *Science*. – 2000. – 288. – P. 1051–1053.
138. Osterholm, M. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis / M. Osterholm, N. Kelley, A. Sommer, E. Belongia // *The Lancet, Infectious Diseases*. – 2012. – 1(12). – P. 36–44.
139. Ottolini, M. The cotton rat provides a useful small-animal model for the study of influenza virus pathogenesis / M. Ottolini // *Journal of General Virology*. – 2005. – 10(86). – P. 2823–2830.
140. Racaniello, V. Isolation of influenza C virus recombinants / V. Racaniello, P. Palese // *Journal of Virology*. – 1979. – 3(32). – P. 1006–1014.
141. Reed, L. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. Reed, H. Muench // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – 27. – P. 483–856.
142. Reeve, P. Studies with a cold-recombinant A/Victoria/3/75 (H3N2) virus. I. Biologic, genetic, and biochemical characterization / P. Reeve, J. Almond, V. Felsenreich // *J. Infect. Dis.* – 1980. – 6(142). – P. 850–856.
143. Renegar, K. Influenza virus infections and immunity: a review of human and animal models / K. Renegar // *Laboratory Animal Science*. – 1992. – 3(42). – P. 222–232.
144. Riel, D. van Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cells in the Lower Respiratory Tract of Humans and Other Mammals / D. Van Riel, V. Munster, E. de Wit, et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2007. – 4(171). – P. 1215–1223.
145. Rogers, G. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates / G. Rogers, B. D'Souza // *Virology*. – 1989. – 173. – P. 317–322.
146. Romanova, J. Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line / J. Romanova, D. Katinger, B. Ferko // *Virus Research*. – 2004. – 1–2(103). – P. 187–193.
147. Ronaghi, M. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release / M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, et al. // *Analytical Biochemistry*. 1996. № 1 (242). C. 84–89.
148. Rota, P. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 / P. Rota, T. Wallis, M. Harmon // *Virology*. – 1990. – 175(1). – P. 59–68.

149. Rudenko L. [и др.]. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories // *Vaccine*. – 2016. – 45(34). – P. 5436–5441.
150. Rudenko, L. Current strategies for the prevention of influenza by Russian cold-adapted live influenza vaccine among different populations / L. Rudenko, G. Alexandrova // In: *Proceedings of Options for the Control of Influenza IV*. Hersonissos, Crete, Greece, Amsterdam:Elsevier Science. – 2001. – P. 945–950.
151. Rudenko, L. Fifty years experience with live attenuated influenza vaccines in Russia / L. Rudenko // 2007.
152. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. Coulson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – 12(74). – P. 5463–5467.
153. Scholtissek, C. Source for influenza pandemics / C. Scholtissek // *Eur J Epidemiol*. – 1994. – 4(10). – P. 455–458.
154. Scholtissek, C. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2 / C. Scholtissek, W. Rohde, V. Von Hoyningen, R. Rott // *Virology*. – 1978. – P. 13–20.
155. Schulman, J. Experimental transmission of influenza virus infection in mice. i. the period of transmissibility / J. Schulman // *The Journal of experimental medicine*. – 1963. – 2(118). – P. 257–266.
156. Schulman, J. Experimental transmission of influenza virus infection in mice. 3. Differing effects of immunity induced by infection and by inactivated influenza virus vaccine on transmission of infection / J. Schulman // *J. Exp. Med*. – 1967. – 125. P. 467–478.
157. Schulman, J. Experimental transmission of influenza virus infection in mice: IV. Relationship of transmissibility of different strains of virus and recovery of airborne virus in the environment of infector mice / J. Schulman // *The Journal of experimental medicine*. – 1967. – 3(125). P. 479.
158. Schulman, J. The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection / J. Schulman // *Am. J. Public Health Nations Health*. –1968. – 58. – P. 2092–2096.
159. Schulman, J. Effects of immunity on transmission of influenza: experimental studies / J. Schulman // *Prog. Med. Virol*. – 1970. – 12. – P. 128–160.
160. Schulman, J. Airborne transmission of influenza virus infection in mice / J. Schulman, E. Kilbourne // *Nature*. – 1962. – 195. – P. 1129–1130.
161. Schulman, J. Experimental Transmission of Influenza Virus Infection in Mice. Ii. Some Factors Affecting the Incidence of Transmitted Infection / J. Schulman, E. Kilbourne // *J. Exp. Med*. – 1963. – 118. – P. 267–275.
162. Seo, S-U. Development and characterization of a live attenuated influenza B virus vaccine candidate / S-U. Seo, Y-H. Byun, E-Y. Lee, et al. // *Vaccine*. – 2008. – 7(26). – P. 874–881.
163. Shaw, M. Reappearance and Global Spread of Variants of Influenza B/Victoria/2/87 Lineage Viruses in the 2000–2001 and 2001–2002 Seasons / M. Shaw, X. Xu, Y. Li, et al. // *Virology*. – 2002. – 1(303). – P. 1–8.

164. Shcherbik, S. Rapid Strategy for Screening by Pyrosequencing of Influenza Virus Reassortants - Candidates for Live Attenuated Vaccines / S. Shcherbik, N. Pearce, M. Levine, et al. // PLOS ONE. – 2014. – 3(9). – P. 1–11.
165. Skehel, J. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin / J. Skehel, D. Wiley // *Annu Rev Biochem.* – 2000. – 69. – P. 531–569.
166. Smith, W. A virus obtained from influenza patients / W. Smith, C. Andrewes, P. Laidlaw // *Lancet.* – 1933. – 222. – P. 66–68.
167. Song, H. An open receptor-binding cavity of hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein from newly-identified influenza D virus: basis for its broad cell tropism / H. Song, J. Qi, Z. Khedri, et al. // *PLoS Pathogens.* – 2016. – 1(12). – e1005411.
168. Sreenivasan, C. Replication and Transmission of the Novel Bovine Influenza D Virus in a Guinea Pig Model / C. Sreenivasan, M. Thomas, Z. Sheng, et al. // *Journal of Virology.* – 2015. – 23(89). – P. 11990–12001.
169. Sridhar, S. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines / S. Sridhar, K. Brokstad, R. Cox // *Vaccines.* – 2015. – 2 (3). – P. 373–389.
170. Steel, J. Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment / J. Steel, P. Staeheli, S. Mubareka, et al. // *J. Virol.* – 2010. – 84. – P. 21–26.
171. Stephenson, I. Influenza: vaccination and treatment / I. Stephenson, K. Nicholson // *Eur Respir J.* – 2001. – 6(17). – P. 1282–1293.
172. Su, S. Comparing clinical characteristics between hospitalized adults with laboratory-confirmed influenza A and B virus infection / S. Su, S. Chaves, A. Perez, et al. // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America.* – 2014. – 2(59). – P. 252–255.
173. Tang, X. Histopathology and growth kinetics of influenza viruses (H1N1 and H3N2) in the upper and lower airways of guinea pigs / X. Tang, K. Chong // *Journal of General Virology.* – 2009. – 2(90). – P. 386–391.
174. Taylor, R. Use of hamster (*Cricetus auratus*) for the detection of influenza virus in throat washings / R. Taylor, A. Parodi // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1942. – 49. – P. 105–108.
175. Tewawong, N. Evidence for influenza B virus lineage shifts and reassortants circulating in Thailand in 2014-2016 / N. Tewawong, N. Suntronwong, S. Korkong, et al. // *Infect. Genet. Evol.* – 2017. – 47. – P. 35–40.
176. Treanor, J. Influenza viruses, including avian influenza and swine influenza / J. Treanor // *Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.* – 2010. – P. 2265–2288.
177. Trifonov, V. The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans / V. Trifonov, H. Khiabani, B. Greenbaum, R. Rabadan // *Euro Surveill.* – 2009. – 14(17). – P. 191–193.
178. Tsai, C-P. Influenza B Viruses in Pigs, Taiwan / C-P. Tsai, H-J. Tsai // *Influenza and Other Respiratory Viruses.* – 2018. – P. 783-790.

179. Van Hoesen, N. Pathogenesis of 1918 Pandemic and H5N1 Influenza Virus Infections in a Guinea Pig Model: Antiviral Potential of Exogenous Alpha Interferon To Reduce Virus Shedding / N. Van Hoesen, J. Belser, K. Szretter, et al. // *Journal of Virology*. – 2009. – 7(83). – P. 2851–2861.
180. Voeten, J. Master donor viruses A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and B/USSR/60/69 and derived reassortants used in live attenuated influenza vaccine (LAIV) do not display neurovirulent properties in a mouse model / J. Voeten, I. Kiseleva, H. Glansbeek, et al. // *Archives of Virology*. – 2010. – 9(155). – P. 1391–1399.
181. Webster, R. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses / R. Webster, W. Laver, G. Air, G. Schild // *Nature*. – 1982. – P. 115–121.
182. WHO Vaccines against influenza WHO position paper [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/wer/2012/wer8747.pdf?ua=1>.
183. WHO Recommendations on the composition of influenza virus vaccines [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>.
184. WHO Types of seasonal influenza vaccine [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/communicable-diseases/influenza/vaccination/types-of-seasonal-influenza-vaccine>.
185. WHO Influenza [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
186. WHO Review of the 2018–2019 influenza season in the northern hemisphere [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326242/WER9432-en-fr.pdf?ua=1>.
187. WHO Avian influenza: assessing the pandemic threat [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68985/1/WHO_CDS_2005.29.pdf.
188. Wright, P. Orthomyxoviruses / P. Wright, R. Webster, D. Knipe, P. Hawley // *Fields Virology*. – 2001. – 2. – P. 1533–1579.
189. Wright, P. T. Live attenuated influenza vaccines / P. Wright, D. Karzon // *Progr. Med. Virol.* – 1987. – 34. – P. 70–88.
190. Wright, P. Orthomyxoviruses / P. Wright, G. Neumann, Y. Kawaoka, et al. // *Fields Virology*. – 2006. – 87. – P. 1691–1740.
191. Xu, X. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses / X. Xu, S. Lindstrom, M. Shaw, et al. // *J. Virus Research*. – 2004. – 1–2(103). – P. 55–60.
192. Yasugi, M. Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus / M. Yasugi, R. Kubota-Koketsu, A. Yamashita, et al. // *PLoS pathogens*. – 2013. – 2(9). – e1003150.
193. Zheng, H. Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication / H. Zheng, H. Lee, P. Palese, A. Garcia-Sastre // *J. Virol.* – 1999. – 6(73). – P. 5240–5243.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

ПЕРЕЧЕНЬ ТАБЛИЦ:

2.1	Список используемых в работе вирусов.....	33
2.2	Параметры оценки температурочувствительности (<i>ts</i> -фенотип) и холодаадаптированности (<i>ca</i> -фенотип) вирусов гриппа в опытах на РКЭ.....	34
2.3	Расположение участков отжига праймеров этапов ПЦР и пиросеквенирования, подобранных к консервативным участкам последовательности вирусов гриппа В.....	38
3.1	Фенотипические характеристики доноров аттенуации и клонов подготовленных основе резервного донора В/Ленинград/14/17/55.....	41
3.2	Нуклеотидные и аминокислотные замены альтернативного донора аттенуации В14/710.....	43
3.3	Биологические свойства доноров аттенуации В14/710, В60.....	44
4.1	Последовательность праймеров этапов ПЦР и пиросеквенирования для генотипирования реассортантов вируса гриппа В.....	47
4.2	Последовательность нуклеотидов на секвенируемом участке у изученных вирусов гриппа В, а также порядок внесения нуклеотидов в реакционную смесь при пиросеквенировании, позволяющий генотипировать анализируемые вирусы.....	48
4.3	Состав генома реассортантов, полученных при скрещивании В/Ленинград/14/17/55 и В/Indiana/25/2015, I клонирование.....	52
4.4	Состав генома реассортантов, полученных при скрещивании В/Ленинград/14/17/55 и В/Indiana/25/2015, II клонирование.....	53
5.1	Роль генов в формировании температурочувствительного фенотипа.....	55
5.2	Репликация <i>ts</i> реассортантов в легких мышей на 3 сутки после интраназального заражения.....	56
5.3	Интенсивность репродукции доноров аттенуации и одногенного реассортанта на их основе в легких мышей.....	58
6.1	Состав вакцин, использованных в экспериментах на хорьках.....	59
6.2	Схема изучения кросс-протективности моновалентной ЖГВ типа В в экспериментах на хорьках.....	60
6.3	Проявление клинических симптомов у хорьков после иммунизации моновалентной живой гриппозной вакцины.....	61
6.4	Репликация вирусов в верхних дыхательных путях хорьков после иммунизации моновалентной ЖГВ.....	62
6.5	Проявление клинических симптомов у хорьков в челлендж-эксперименте.....	63
6.6	Средний геометрический титр антител к эпидемическим вирусам гриппа В в сыворотках крови иммунизированных хорьков.....	64
6.7	Схема изучения кросс-протективности трехвалентной ЖГВ в экспериментах на хорьках.....	65
6.8	Проявление клинических симптомов хорьков после иммунизации Т-ЖГВ.....	66
6.9	Интенсивность репликация вируса в ВДП хорьков после иммунизации Т-ЖГВ...	67
6.10	Проявление клинических симптомов у иммунизированных хорьков в челлендж-эксперименте.....	68
6.11	Иммунный ответ у хорьков на введение Т- и К-ЖГВ в челлендж-эксперименте...	71

ПЕРЕЧЕНЬ РИСУНКОВ:

3.1	Хроматограмма участков генов PB2, PB1 и NP неклонированного донора В/Ленинград/14/17/55 и его клона В14/710.....	42
3.2	Иммуногенность вакцинных штаммов, подготовленных на основе доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В/14/710, на модели мышей линии СВА.....	45
4.1	Электрофореграмма после амплификации биотинилированных праймеров этапа ПЦР.....	49
4.2	Пирограммы, полученные путем секвенирования участков генов вирусов В60, В14, В/Ind, В/Ph, В/Mass и В/Vg методом пиросеквенирования.....	50
4.3	Пирограммы чистых и смешанных реассортантов вирусов гриппа В.....	51
5.1	Инфекционные титры доноров аттенуации ЖГВ и их реассортанта В14–В60 при разных температурах инкубации.....	57
6.1	Репликация челлендж–вируса у хорьков, иммунизированных живой гриппозной моновакциной типа.....	63
6.2	Температура тела животных после иммунизации Т-ЖГВ.....	66
6.3	Динамика изменения температура тела хорьков, предварительно иммунизированных Т–ЖГВ или К–ЖГВ, после челленджа «дикими» вирусами гриппа.....	69
6.4	Интенсивность репликации челлендж–вируса в респираторном тракте хорьков, предварительно вакцинированных Т–ЖГВ или К–ЖГВ	70