

ФГБНУ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ЛАРИОНОВА
Наталья Валентиновна

**ВОЗБУДИТЕЛЬ ГРИППА: ИЗМЕНЧИВОСТЬ В
ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.02.02 - вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
*на соискание ученой степени
доктора биологических наук*

Научный консультант:

Доктор биологических наук И.В. КИСЕЛЕВА

Санкт-Петербург
2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

РАЗДЕЛ I ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ II ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	16
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
ГЛАВА 1 СТРУКТУРА И РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА	16
1.1 Общая характеристика вирусов гриппа	16
1.2 Структурная организация вириона, геном и вирусспецифические белки	18
1.3 Репродукция вируса гриппа в чувствительной клетке	26
ГЛАВА 2 ЭКОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА	30
2.1 Экология вирусов гриппа: «единый мир – общая угроза»	30
2.2 Возникновение и эволюция вирусов гриппа человека	34
2.2.1 Эволюция генома	34
2.2.2 Антигенная эволюция вирусов гриппа: шифт и дрейф	36
2.3 Вирусы гриппа, обладающие пандемическим потенциалом	47
2.4 Факторы патогенности и трансмиссивности вирусов гриппа с пандемическим потенциалом	51
2.5 Факторы эволюции, влияющие на вирулентность сезонных вирусов гриппа	56
ГЛАВА 3 ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ АТТЕНУИРОВАННАЯ РЕАССОРТАНТНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ	63
3.1 Вакцинация как профилактика гриппозных инфекций	63
3.2 Характеристика аттенуированной реассортантной живой гриппозной вакцины	66
3.2.1 Разработка живой гриппозной вакцины в России	66
3.2.2 Разработка и характеристика доноров аттенуации	67
3.2.3 Свойства живой гриппозной вакцины	70
3.2.4 Пандемические живые гриппозные вакцины	74
ГЛАВА 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	77
4.1 Объект исследования	77
4.2 Вирусологические методы исследований	78
4.2.1 Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах	78
4.2.2 Получение аттенуированных штаммов ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ	79
4.2.3 Культивирование вирусов в культуре клеток	82
4.3 Серологические методы исследований	82
4.4 Исследования на лабораторных животных	83
4.4.1 Оценка безвредности штаммов живой гриппозной вакцины	84
4.4.2 Иммунологические исследования вакцинных штаммов <i>in vivo</i>	86
4.5 Молекулярно-генетические методы исследования	87
4.5.1 Характеристика формулы генома реассортантных вирусов с помощью RFLP-анализа (модифицированный авторский метод)	87
4.5.2 Характеристика сохранности мутаций, специфичных для донора аттенуации, у реассортантных вирусов гриппа А с помощью RFLP анализа	88
4.5.3 Характеристика формулы генома реассортантных вирусов с помощью мультиплекс (да-нет)-PCR анализа (модифицированный авторский метод)	88
4.5.4 Секвенирование последовательностей сегментов генома	89
4.6 Изоляция вакцинных вирусов от привитых лиц при клинических исследованиях на ограниченных контингентах добровольцев	90

4.7	Статистическая обработка данных	90
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		91
ГЛАВА 5 РОЛЬ ГЕНОВ В АТТЕНУАЦИИ ВИРУСА ГРИППА		91
5.1	Роль генов донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в формировании <i>ts</i> фенотипа реассортантных вирусов гриппа А	91
5.2	Получение и характеристика чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69	94
5.2.1	Характеристика биологических свойств гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69	94
5.2.2	Молекулярно-генетический анализ клонов из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69	97
5.2.3	Изучение репродуктивности и иммуногенности клонов донора аттенуации В60/252 и В60/525 в опытах на экспериментальных животных	98
5.3	Роль генов донора аттенуации В/СССР/60/69/525 в формировании <i>ts</i> фенотипа реассортантных вирусов гриппа В	100
5.4	Роль генов донора аттенуации В/СССР/60/69/525 в формировании <i>sa</i> фенотипа реассортантных вирусов гриппа В	101
5.5	Идентификация уникальных мутаций в геноме донора аттенуации В/СССР/60/69/525	102
5.5.1	Поиск гипотетического «дикого» родителя донора аттенуации В/СССР/60/69	104
5.5.2	Идентификация уникальных замен в геноме донора аттенуации В/СССР/60/69/525, не имеющих аналогов у циркулирующих в природе вирусов гриппа	108
ГЛАВА 6 ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА		112
6.1	Изменение признака чувствительности к температуре репродукции как отражение эволюционной изменчивости эпидемических вирусов гриппа	112
6.1.1	Характеристика признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А (H1N1) разных лет выделения	113
6.1.2	Характеристика признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А (H2N2) разных лет выделения	115
6.1.3	Характеристика признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А (H3N2) разных лет выделения	117
6.1.4	Характеристика признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа В разных лет выделения	119
6.1.5	Оценка температурочувствительности социркулирующих антигенно однородных эпидемических вирусов гриппа	124
6.1.6	Характеристика эпидемических вирусов гриппа по признаку устойчивости к пониженной температуре репродукции	130
6.2	Изменение признака чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови у вирусов гриппа в природе и эксперименте	132
6.2.1	Характеристика эпидемических вирусов гриппа А и В разных лет выделения по признаку чувствительности к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови	132
6.2.2	Характеристика антигенно родственных изолятов вируса гриппа из одного эпидемического сезона по признаку ингибиторочувствительности	135
6.2.3	Выявление мутаций в молекуле гемагглютинаина, имеющих возможную связь с признаком ингибиторочувствительности вирусов гриппа В	139
6.3	Роль нейраминидазы в проявлении чувствительности вирусов гриппа к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови	142
ГЛАВА 7 РЕАССОРТАНТНЫЕ ШТАММЫ ДЛЯ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН К		146

	СОВРЕМЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА	
7.1	Принципы подготовки и доклинической характеристики штаммов живых гриппозных аттенуированных вакцин на основе сезонных вирусов гриппа А и В	146
7.1.1	Доклиническая характеристика штаммов живой гриппозной вакцины к сезонным вирусам гриппа в экспериментах <i>in vitro</i>	149
7.1.2	Молекулярно-генетический анализ штаммов живой гриппозной вакцины к сезонным вирусам гриппа	157
7.1.3	Доклиническая характеристика штаммов живой гриппозной вакцины к сезонным вирусам гриппа в экспериментах <i>in vivo</i>	165
7.1.4	Репродуктивность сезонной трехвалентной живой гриппозной вакцины в наблюдениях на детях 3-6 лет	166
7.2	Разработка штамма живой гриппозной вакцины к пандемическому вирусу гриппа А (H1N1)pdm2009 и его доклинические исследования	171
7.2.1	Подготовка штамма живой гриппозной пандемической вакцины методом классической реассортации	172
7.2.2	Доклиническая характеристика реассортантного штамма живой гриппозной пандемической вакцины в экспериментах <i>in vitro</i>	172
7.2.3	Молекулярно-генетический анализ вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm	174
7.2.4	Доклиническая характеристика реассортантного штамма живой гриппозной пандемической вакцины А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm в экспериментах <i>in vivo</i>	175
7.3	Разработка штамма живой гриппозной вакцины к потенциально пандемическому свиному вирусу гриппа А/Индиана/10/11 (H3N2)v и его доклинические исследования	178
7.3.1	Характеристика биологических свойств вируса свиного гриппа А/Индиана/10/2011 (H3N2)v	178
7.3.2	Подготовка штамма живой гриппозной вакцины на основе вируса свиного гриппа А(H3N2)v методом классической реассортации	179
7.3.3	Доклиническая характеристика штамма живой гриппозной вакцины А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v в экспериментах <i>in vitro</i>	180
7.3.4	Молекулярно-генетический анализ штамма живой гриппозной вакцины А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v к вирусу свиного гриппа	181
7.3.5	Доклинические исследования штамма живой гриппозной вакцины А/17/Индиана/11/72 (H3N2)v в экспериментах <i>in vivo</i>	183
7.4	Разработка штаммов живой гриппозной вакцины к высокопатогенным потенциально пандемическим вирусам гриппа птиц А (H5N1) и их доклинические исследования	183
7.4.1	Подготовка реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины к высокопатогенным вирусам гриппа птиц А (H5N1)	183
7.4.2	Доклиническая характеристика реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины к высокопатогенным вирусам гриппа птиц А (H5N1) в экспериментах <i>in vitro</i>	187
7.4.3	Молекулярно-генетический анализ реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины к высокопатогенным вирусам гриппа птиц А(H5N1).....	187
7.4.4	Доклиническая характеристика штаммов живой гриппозной вакцины к высокопатогенным вирусам гриппа птиц А(H5N1) в экспериментах <i>in vivo</i>	190
7.4.5	Оценка генетической и фенотипической стабильности изолятов ЖГВ к потенциально пандемическому вирусу гриппа птиц	

А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) от привитых волонтеров	197
7.5 Эффективность подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе отличающихся по биологическим характеристикам вирусов гриппа	200
7.5.1 Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе пандемических и обладающих пандемическим потенциалом вирусов гриппа	201
7.5.2 Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе отличающихся по биологическим характеристикам сезонных вирусов гриппа	203
ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	211
РАЗДЕЛ III ЗАКЛЮЧЕНИЕ	230
ВЫВОДЫ	233
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	237
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	290
ПРИЛОЖЕНИЯ	296
ПРИЛОЖЕНИЕ А	296
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	303
ПРИЛОЖЕНИЕ В	315

РАЗДЕЛ I

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Значительные успехи вирусологии в познании структуры репродукции, генетики и иммунологии вируса гриппа не привели до сих пор к существенному прогрессу в борьбе с самим заболеванием. Ежегодные эпидемии гриппа приводят к 3-5 миллионам случаев тяжелой заболеваемости и к 250-500 тысячам смертельных исходов [566]. Вирусная и вторичная бактериальная пневмония – серьезные осложнения гриппозной инфекции и частая причина смертности лиц пожилого возраста, маленьких детей и людей, страдающих хроническими сердечно-легочными заболеваниями. Возникновение пандемий гриппа не поддается прогнозированию, и угроза пандемии, подобной «испанке», унесшей в 1918/19 гг. 40-50 миллионов жизней, продолжает существовать [401].

Урон, наносимый гриппом здоровью людей и экономике государств, определяет необходимость исследования проблемы во всех ее аспектах.

Изучение разных проявлений изменчивости вируса гриппа в процессе циркуляции в восприимчивой популяции крайне важно для понимания общих закономерностей эволюции возбудителя, механизмов возникновения новых эпидемических штаммов, роли в этих процессах генов, кодирующих негликозилированные белки, и, в конечном итоге, для разработки эффективных средств профилактики гриппозной инфекции.

Вся история успеха борьбы с инфекционными заболеваниями человека и животных связана с использованием вакцин. Разработка живой гриппозной аттенуированной вакцины (ЖГВ) началась в 1937 году, вскоре после открытия вирусной этиологии заболевания. Мировой приоритет в этом направлении принадлежит коллективу отдела вирусологии Института экспериментальной медицины (ныне ФБГНУ «ИЭМ») [4, 67, 123, 471], в котором выполнено настоящее исследование.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ. Прогрессу в создании эффективной и безопасной живой гриппозной вакцины способствовала идея, основанная на использовании уникальных особенностей вирусов гриппа: способности к реассортации между вирусами одного биологического рода и высокой мутационной изменчивости, которая дает возможность манипулировать с вирусами гриппа в лабораторных условиях и направленно формировать необходимые биологические качества. С помощью селективных условий были созданы так называемые доноры аттенуации. Это вирусы устаревшей антигенной природы, которые были

адаптированы к репродукции при пониженной температуре инкубации. В результате такой «холодовой» адаптации вирусы приобрели не только способность к воспроизведению при температурах ниже физиологического оптимума – *ca* (*cold adapted*) фенотип, но утратили способность к репродукции при повышенных температурах – *ts* (*temperature sensitive*) фенотип. *Ts* фенотип доноров аттенуации сопряжен с их аттенуацией (*attenuation, att*) для лабораторных животных и человека [323]. Генетически стабильные доноры аттенуации, являются основой 6:2 реассортантов для ЖГВ. Вместе с 6 генами, кодирующими внутренние белки вириона, они передают вакцинным штаммам *ts/ca/att* фенотип. Эпидемическая актуальность вакцинного реассортанта обеспечивается наследованием генов HA и NA, кодирующих два основных антигена вируса гриппа [5].

Свойства живых гриппозных реассортантных вакцин, подготовленных на основе отечественных холодаадаптированных и температурочувствительных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (A17) и В/СССР/60/69 (B60), исследуются в России с 1977 года. Многократные клинические испытания с участием 150 тыс. детей и 500 тыс. взрослых подтвердили их безусловную безвредность и эффективность [20, 469, 470, 471]. С 1987 года реассортантная ЖГВ применяется в России для всех возрастных групп населения, начиная с 3-летнего возраста.

Все эти годы углублялись знания о молекулярно-генетических основах аттенуации доноров и созданных на их основе реассортантов. Отечественный донор А17 охарактеризован наиболее полно. Была выявлена его гетерогенность и установлены различия в иммунологической активности различных его клонов [604]. Молекулярно-генетические исследования одногенных и полигенных реассортантов между клонированным донором А17 и его «диким» предшественником позволили установить определяющую роль мутантных генов полимеразного комплекса в аттенуации донора и реассортантов с различным набором «диких» генов предшественника [320]. Были охарактеризованы мутации в генах полимеразного комплекса, ответственные за проявление холодаадаптированного, температурочувствительного и непосредственно связанного с температурочувствительностью аттенуирующего фенотипа донора А17 [288, 317, 320, 322]. Установленные факты характеризуют влияние приобретенных мутаций на формирование свойств самого донора аттенуации. Однако, не менее важной представляется характеристика роли мутантных генов донора аттенуации А17, находящихся в окружении генов не собственного «дикого» предшественника А/Ленинград/134/57 (H2N2), а современных генетически удаленных от него эпидемических вирусов. Это позволит оценить взаимодействие чужеродных генов в составе изучаемых реассортантных вирусов и условия наследования реассортантами *ts*, *ca* и *att* фенотипа от донора аттенуации. К предпринятым

ранее разрозненным исследованиям одногенных и полигенных реассортантов на основе донора аттенуации A17 и эпидемических вирусов требовалось подойти более системно.

Донор аттенуации B60 до настоящего исследования был слабо охарактеризован. Он не был клонирован, а, следовательно, можно было с большой долей вероятности предполагать генетическую неоднородность его популяции, что могло сказываться на различии в характеристиках и иммуногенности вакцинных штаммов. Не была изучена роль отдельных мутантных генов в аттенуации. Не были описаны аттенуирующие мутации, появившиеся в результате подготовки донора B60 из «дикого» предшественника.

Метод получения вакцинных реассортантов, разработанный в 1970-х годах, основан на различиях биологических свойств созданных в лаборатории *ts/ca/att* доноров аттенуации и естественно циркулирующих эпидемических вирусов гриппа. Ко времени разработки метода все циркулирующие вирусы гриппа А и В характеризовались устойчивостью репродукции при превышающих физиологический оптимум температурах (*non-ts* фенотип), и отсутствием способности к репродукции при пониженных температурах инкубации (*non-ca* фенотип) [435]. Эти характеристики считались неотъемлемым признаком всех патогенных штаммов. Заложенные в метод реассортации различия в характеристиках доноров и эпидемических вирусов позволили подобрать селективные условия для успешной подготовки вакцинных штаммов и использовать *ts* и *ca* фенотип как маркеры аттенуации реассортантов.

С постепенным накоплением сведений о циркуляции вирусов гриппа в биосфере стало очевидным, что свойства вируса, которые успешно удается видоизменять в условиях лаборатории, при естественной циркуляции вирусов также подвержены изменчивости. Среди современных возбудителей гриппозных инфекций были отмечены факты циркуляции вирусов гриппа с нехарактерными для высоковирулентных вирусов признаками. Это касается температурочувствительности, холодоустойчивости репродукции не только ряда природных изолятов, но и эталонных вирусов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для разработки актуальных вакцинных штаммов. А поскольку свойства эпидемических вирусов заложены в методику подготовки реассортантов для ЖГВ как неизменный стандарт, то выявленная их вариабельность накладывает отпечаток на процесс селекции клонов с вакцинной формулой генома, осложняя подготовку вакцинных штаммов. Часто наблюдаемая чувствительность современных вирусов к неспецифическим температуроустойчивым ингибиторам сыворотки крови также становится препятствием для стабильной подготовки вакцинных реассортантов для ЖГВ, поскольку в селекции вакцинных клонов участвует сыворотка против донора аттенуации.

Естественная изменчивость таких признаков вирусов гриппа, как температурный диапазон репродукции, чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови,

сопряженная с рецепторной специфичностью штаммов, имеет несомненное, однако до настоящего времени слабо изученное значение в эволюции вирусов гриппа.

В целях эффективной разработки сезонных живых гриппозных реассортантных вакцин, назрела необходимость введения корректив в метод подготовки вакцинных штаммов с учетом индивидуальных биологических особенностей эволюционирующих вирусов.

До представляемой работы опыт использования метода классической реассортации сводился к разработке 6:2 штаммов ЖГВ на основе дрейфовых сезонных вирусов гриппа человека. Пандемия гриппа A(H1N1)pdm09, также как и вспышка заболеваемости людей гриппом, вызванным вирусом свиней A(H3N2)v, стали проверкой эффективности классического метода подготовки реассортантных аттенуированных ЖГВ на основе незнакомых человеку ранее возбудителей гриппа.

В связи с возникновением новых потенциально пандемических угроз, в частности, таких, как высоковирулентные вирусы гриппа птиц A(H5N1), причастные к случаям летальных инфекций людей, ВОЗ разработала глобальную стратегию обеспечения готовности к пандемии [573]. В эту стратегию входит задача создания коллекции кандидатных вакцинных вирусов гриппа на случай необходимости их внезапного использования. Для успешного получения ЖГВ на основе патогенных для развивающихся куриных эмбрионов вирусов гриппа птиц была необходима существенная модификация метода подготовки реассортантных штаммов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Выше изложенное определяет актуальность представляемых исследований и позволяет сформулировать основную ЦЕЛЬ настоящей работы, как изучение закономерностей изменчивости биологических свойств вирусов гриппа А и В в природе и эксперименте.

В соответствии с целью, поставлены следующие ЗАДАЧИ исследования:

1. Определение молекулярно-генетических механизмов индуцированной изменчивости фенотипических признаков вируса гриппа в эксперименте.
2. Характеристика закономерностей эволюционной изменчивости биологических признаков вирусов гриппа.
3. Разработка новых принципов подготовки реассортантных штаммов ЖГВ для сезонных и обладающих пандемическим потенциалом вирусов гриппа.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

1. Впервые установлена роль мутантных генов полимеразного комплекса в приобретении донором аттенуации для ЖГВ В/СССР/60/69 и реассортантными штаммами на его основе температурочувствительного и холодоустойчивого фенотипа.

2. Сформулировано положение о едином механизме аттенуации вирусов гриппа А и В, связанном с изменением температурного диапазона функционирования белков полимеразного комплекса.
3. Впервые прослежены закономерности эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности репродукции. Продемонстрирован волнообразный (циклический) характер изменения признака устойчивости/чувствительности к температурам, превышающим физиологический оптимум, и проведена связь этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов. Высказано предположение, что эволюцию вирусов гриппа следует рассматривать не только с позиции его антигенной изменчивости, но и принимать во внимание изменение других биологических признаков, в частности температурочувствительность репродукции.
4. Впервые представлены различия антигенных ветвей В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных вирусов гриппа по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, что является опосредованным указанием на различия в их рецепторной специфичности.
5. Продемонстрирована прямая зависимость эффективности формирования вакцинных реассортантов с формулой генома 6:2 от таких фенотипических особенностей эпидемических родительских вирусов гриппа А и В, как чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови.
6. Впервые установлено влияние нейраминидазы устойчивого к ингибиторам сыворотки крови донора аттенуации на снижение уровня ингибиторочувствительности реассортантов, наследующих от ингибиторочувствительных «диких» вирусов гриппа А и В единственный ген гемагглютинина. Выявленная закономерность свидетельствует о комплексном участии гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к ингибиторам сыворотки крови и опосредованным указанием на взаимное участие белков НА и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.
7. Установлены ограничения в способности к реассортации между донором аттенуации на основе вируса гриппа человека А(Н2N2) и штаммами А(Н5N1)-PR8-RG для инактивированной ЖГВ. Подобное скрещивание дает возможность получать температурочувствительные, холодоустойчивые вакцинные реассортанты на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) с наследованием от высокопатогенных вирусов гриппа птиц единственного гена НА (Н5) (формула генома 7:1).

8. Выявлено сцепленное наследование генов NA и PB2 родительского вируса NIBRG-23, происходящих от вируса гриппа птиц А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1) и А/PR8/34 (H1N1) соответственно, при скрещивании его с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2).
9. Разработан новый методический подход к получению штаммов аттенуированной ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1) с использованием модифицированных, сконструированных методами обратной генетики штаммов для инактивированной вакцины А(H5N1)-PR8-RG, позволяющий проводить реассортацию в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и безопасный для персонала.
10. Доклиническая характеристика авторских штаммов живой гриппозной вакцины к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 и потенциально пандемическим высоковирулентным вирусам гриппа птиц А(H5N1) показала их генетическую и фенотипическую стабильность, аттенуацию, высокую иммуногенность и протективную активность для лабораторных животных.
11. Впервые на добровольцах, привитых живой гриппозной вакциной А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) на основе высоковирулентного потенциально пандемического вируса гриппа птиц, показана высокая приживляемость, фенотипическая и генетическая стабильность аттенуирующих мутаций в реизолятах вакцинного вируса от привитых, отсутствие трансмиссивности непривитым лицам группы плацебо.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В процессе работы по созданию штаммов ЖГВ накопились многолетние наблюдения за вариабельностью биологических характеристик у циркулирующих вирусов гриппа А и В, что позволило выявить определенные эволюционные закономерности. Эти исследования, наряду с молекулярно-генетической характеристикой донора аттенуации В/СССР/60/69, и формулировкой представления о единстве молекулярных основ проявления *ts/ca/att* фенотипа доноров аттенуации А и В для ЖГВ являются фундаментальным вкладом представленной работы в вирусологию гриппа.

Автором подготовлены 20 аттенуированных холодоадаптированных реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины на основе сезонных возбудителей гриппа А (H1N1, H3N2) и В и пандемического вируса гриппа А(H1N1)09pdm. На эти штаммы ЖГВ получены 19 патентов на изобретение РФ, на один штамм подана заявка на патент РФ.

Впервые живая гриппозная вакцина А/17/Калифорния/2009/38 на основе пандемического вируса А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09 зарегистрирована в России.

За разработку вакцинного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm для производства ЖГВ для взрослых и детей (патент РФ № 2413765) авторы удостоены

диплома Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам в номинации «100 лучших изобретений России» (Приложение А).

Подготовленные автором холодоадаптированные реассортантные штаммы ЖГВ депонированы в Государственных коллекциях вакцин на базе ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» МЗ России и Института вирусологии им.Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России: А/17/Иоганнесбург/94/1 (H3N2) (ГИСК №391), А/17/Нанчанг/95/20 (H3N2) (ГИСК №1001), А/47/Нанчанг/95/13 (H3N2) (ГИСК №1002), В/60/Петербург/95/20 (ГИСК №1003), В/60/Иоханнесбург/99/50 (ГИСК №398/9), А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2) (ГИСК №144), В/60/Джилин/03/1(ГИСК №143), В/60/Малайзия/04/898 (НИИ вирусологии №2411, ГИСК №721), В/60/Флорида/04/181 (НИИ вирусологии №2724, ГИСК №722), А/17/Соломоновы острова/06/9 (H1N1) (ГИСК №751), А/17/Брисбен/07/28 (H1N1) (ГИСК №789), А/17/Брисбен/07/1 (H3N2) (ГИСК №788), В/60/Брисбен/08/83 (ГИСК №796), А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 (ГИСК №801), В/60/Висконсин/2010/125 (НИИ вирусологии №2723), А/17/Виктория/2011/89 (H3N2) (НИИ вирусологии №2724), А/17/Индиана/11/72(H3N2v) (НИИ вирусологии №2739), В/60/Массачусетс/2012/10 (НИИ вирусологии №2740), А/17/Техас/2012/30 (H3N2) (НИИ вирусологии №2737) и В/60/Пхукет/2013/26 (НИИ вирусологии №2808).

Подготовленные автором штаммы ЖГВ на основе высоковирулентных вирусов гриппа птиц А(H5N1) А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005, А/индюк/Турция/1/2005 и вируса свиного гриппа А/Индиана/10/2011 (H3N2)v составляют отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа.

Из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69 отобрана и охарактеризована чистая линия, обладающая наиболее удачным сочетанием полезных признаков и позволяющая создавать генетически стабильные реассортантные вакцинные штаммы. Клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69/525 применяется для получения штаммов ЖГВ с 2003 года.

Предложен ряд методических приемов, позволяющих максимально эффективно готовить реассортантные вакцинные штаммы на основе эпидемических вирусов, обладающих различными биологическими свойствами, в том числе не только вирусов гриппа человека, но и потенциально пандемических вирусов гриппа птиц.

Начиная с 2009 года, в соответствии с договором с ВОЗ, отдел вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» передает штаммы реассортантной ЖГВ в развивающиеся страны для производства на их основе национальных ЖГВ [341]. ЖГВ к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09, а затем и к сезонным вакцинам были переданы в Индию (SI), где к настоящему времени выпущено 3 миллиона доз вакцины Nasovac[©], а в 2010 году было привито

2,5 млн. человек вакциной к пандемическому гриппу А(Н1N1)pdm09, в Тайланд (GPO), где ЖГВ к вирусу А(Н1N1)pdm09 была зарегистрирована, и в Китай (ВСНТ), где ЖГВ на основе подготовленных в отделе вирусологии штаммов, в том числе авторских, проходят клинические испытания.

Реализация и внедрение результатов работы. Разработанная модификация метода получения аттенуированных реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе современных вирусов гриппа используется в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» и в Центре по контролю и предупреждению заболеваний (CDC, Атланта, США).

Регулярно, с 1995 года по настоящее время, штаммы ЖГВ передаются в ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России для промышленного производства интраназальной живой гриппозной аттенуированной вакцины для взрослых и для детей. За 1995-2015 гг. автором подготовлено и передано в «Микроген» 19 штаммов (Приложение А, Акт внедрения).

Переданные в ВОЗ вакцинные штаммы А/17/Калифорния/2009/38 (Н1N1)pdm, А/17/Виктория/2011/89 (Н3N2), В/60/Висконсин/2010/125, А/17/Техас/2012/30 (Н3N2), В/60/Массачусетс/2012/10, стали основой для наработки национальных живых гриппозных вакцин в развивающихся странах: Индии, Таиланде и Китае.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Методологической основой проведенных исследований является совокупность вирусологических и молекулярно-биологических методов. В процессе работы использовались вирусологические и молекулярно-биологические методы, как классические, так и разработанные автором.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Гены полимеразного комплекса играют определяющую роль в формировании *ts* и *sa* фенотипа вакцинных реассортантов вирусов гриппа А и В на основе отечественных доноров аттенуации. Комбинации мутантных генов PB2, PB1 и PA при обязательном участии гена PB2 ответственны за температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2). Мутации в генах PB2 и PA донора аттенуации В/СССР/60/69 независимо друг от друга приводят к температурочувствительности реассортантного вируса, а мутации в гене PA – и к его холодадаптированности.
2. Эволюция признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А и В носит циклический характер. Появлению нового значимого в эпидемическом отношении вируса гриппа предшествует преобладание в циркуляции температурочувствительных штаммов, что свидетельствует о влиянии температуростойчивости на проявление эпидемических потенций вирусов гриппа.
3. По признаку чувствительности к ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади вирусы гриппа В линий В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 четко различаются.

4. Взаимодействие генов гемагглютинина и нейраминидазы играет комплексную роль в проявлении реассортантными вирусами гриппа чувствительности/устойчивости к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови.

5. Реассортантные штаммы ЖГВ для сезонных и пандемических вакцин, полученные на основе холодоадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и В/СССР/60/69, безопасны, иммуногенны, нетрансмиссивны, обладают высокой генетической и фенотипической стабильностью *in ovo*, в экспериментах на лабораторных животных и в исследованиях экспериментальных ЖГВ на добровольцах.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ. Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена использованием современных средств и методов проведения исследований, значительным объемом работы, комплексным анализом результатов, статистической обработкой данных.

Основные положения диссертации были представлены в 45 докладах на 31 отечественной и международной научных конференциях и симпозиумах: Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика А.А. Смородинцева «Современные аспекты вакцинопрофилактики, химиотерапии, эпидемиологии и диагностики гриппа и других вирусных инфекций» (Санкт-Петербург, 2001), Всероссийской научно-практической конференции «Новые препараты в профилактике, терапии и диагностике вирусных инфекций» (Санкт-Петербург, 2002), V-й Международной конференции по контролю за гриппом (Окинава, Япония, 2003), Первой Европейской конференции по гриппу (Сент-Джулиан, Мальта, 2002), Международной конференции «Гриппозные вакцины для всего мира» (Лиссабон, Португалия, 2004), Международной научной конференции «Актуальные вирусные инфекции – теоретические и практические аспекты» (Санкт-Петербург, 2004), Первой Всероссийской конференции по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций» (Москва, 2004), Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), 3-ей Международной научной конференции по Ортомиксовирусам (Кембридж, Великобритания, 2005), 2-ой Международной научной конференции «Гриппозные вакцины для мира» (Вена, Австрия, 2006), XXXV неделе науки СПбГПУ (Санкт-Петербург, 2007), VI-й Международной конференции по контролю за гриппом (Торонто, Канада, 2007), 11-й медико-биологической Всероссийской конференции «Человек и его здоровье», 3-й европейской ESWI конференции по гриппу (Виламоура, Португалия, 2008), 12-й Всероссийской медико-биологической конференции. «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009), Международной научной конференции «Противогриппозные вакцины нового поколения» (Санкт-Петербург, 2009), Международной научно-практической

конференции, посвященной Всемирному дню здоровья (Киев, Украина, 2010), 17-м Международном конгрессе медицинских наук (ISCOMS) (Гренинген, Голландия, 2010), 14-й Международной конференции «Биология. Наука XXI века», (Пушино, 2010), VII-й Международной конференции по контролю за гриппом (Гонконг, Китай, 2010), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2010), 4-й европейской ESWI конференции по гриппу (Мальта, 2011), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе» (Москва, 2011), 2-й международной конференции. Биотех-2011 (Астана, Казахстан, 2011), Всероссийской конференции–школе «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120–летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2011), Научно–практической конференции по проблеме «Грипп: эпидемиология, профилактика, лечение» (Санкт-Петербург, 2011), всемирном конгрессе «Человеческие факторы риска» (Лондон, Великобритания, 2012), Юбилейной научно-практической конференции к 45-летию НИИ гриппа «Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение» (СПб, 2012), VIII-й Международной конференции по контролю за гриппом (Кейптаун, ЮАР, 2013), научно–практической конференции НИИ им. Пастера «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2014), 5-й европейской ESWI конференции по гриппу (Рига, Латвия, 2014), 9-м конгрессе «Vaccine & ISV» (Сеул, Ю. Корея, 2015).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ ВКЛЮЧЕН В РАЗДЕЛ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

РАЗДЕЛ II ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА I СТРУКТУРА И РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА

1.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА

Вирусы гриппа входят в семейство Orthomyxoviridae. Члены семейства, включающие шесть родов [331], характеризуются сходством в строении вирусной частицы и способом воспроизведения. Это оболочечные РНК-содержащие вирусы с одноцепочечным сегментированным минус-нитевым геномом [415, 436, 591]

Таксономическое деление вирусов гриппа основывается на их антигенных характеристиках. По антигенной специфичности внутренних структурных компонентов вириона: белка нуклеопротеина (NP) и матричного белка (M1), они подразделяются на три рода А, В и С [331]. Вирусы, относящиеся к разным родам, не имеют общих антигенов, отличаются эпидемиологическими особенностями и степенью тяжести вызываемого ими заболевания. Генетическая реассортация между вирусами разных родов не происходит. Сравнительная характеристика вирусов гриппа А, В и С представлена в таблице 1.1.

Вирусы гриппа А широко циркулируют в биосфере и являются наиболее вирулентными патогенами человека. Род вирусов гриппа А подразделяется на сероподтипы в соответствии с антигенными характеристиками двух поверхностных белков: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) [266]. По современной таксономической классификации вирусы гриппа А включают 18 сероподтипов НА и 11 сероподтипов НА [167]. Сероподтипы НА, в свою очередь, формируют две филогенетические группы, заметно различающиеся между собой в антигенном отношении: 1-я группа включает гемагглютинины Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11–Н13, Н16 и Н17, 2-я группа – гемагглютинины Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15 [352].

Вирусы гриппа А человека ежегодно вызывают эпидемии и изредка пандемии. Кроме того, вирусы зоонозного происхождения спорадически инфицируют людей, провоцируя развитие тяжелых респираторных инфекций и высокую смертность. Большинство зоонозных вирусов не способны к устойчивой аэрозольной и респираторно-капельной трансмиссивности от человека к человеку, однако мутации или реассортация с вирусами гриппа человека в

исключительно редких случаях приводит к возникновению нового вируса, передающегося воздушно-капельным путем с пандемическим потенциалом [280].

Только три сероподтипа НА (Н1, Н2 и Н3) и два подтипа NA (N1 и N2) входили в состав возбудителей пандемий и широко циркулировали среди людей в эпоху изучения гриппа [610]. Ежегодные (сезонные) эпидемии, вызванные вирусами гриппа А, обусловлены высокой скоростью антигенных мутаций, которые позволяют вирусу уклоняться от иммунной защиты организма.

Вирусы гриппа родов В и С на сероподтипы не подразделяются и пандемий с их участием не происходит [266]. По-видимому, это связано с тем, что основной хозяин этих вирусов – человек.

Вирусы гриппа В вызывают сезонные эпидемии с типичной картиной гриппозной инфекции. Они тоже подвержены антигенной изменчивости, хотя скорость появления

Таблица 1.1 - Сравнительная характеристика вирусов гриппа родов А, В и С

Свойства		Вирусы гриппа А	Вирусы гриппа В	Вирусы гриппа С
СТРУКТУРА				
Геном	Сегментированная одноцепочечная (-) РНК	8 сегментов	8 сегментов	7 сегментов
Белки	структурные	9 белков	10 белков	8 белков
	неструктурные	1 (NS1) + уникальные	1 (NS1)	1 (NS1)
	уникальные	PB1-F2 ¹ , PB1-N40 ¹ , PA-X ² , PA-N155 ³ , PA-N182 ³ , M-42 ¹ , NS3 ⁴	NB	NEF
КРУГ ХОЗЯЕВ		Человек, птицы, млекопитающие. Природный резервуар: водоплавающие птицы, свиньи, летучие мыши	Человек, отдельные случаи выделения от тюленей, хорьков	Человек, отдельные случаи выделения от свиней
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ		Антигенный шифт и линейный дрейф. Циркулируют и социциркулируют сероподтипы	Антигенный дрейф. Циркулируют и социциркулируют две антигенные ветви	Антигенный дрейф. Социциркулируют множественные варианты
КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ		Сезонный характер эпидемий. Пандемии с высокой смертностью, эпидемии различной тяжести	Сезонный характер эпидемий. Тяжелая заболеваемость ассоциирована с детским контингентом, группами риска, пожилыми людьми	Без сезонности. Мягкая заболеваемость

Ссылки на литературные источники: ¹[586], ²[293], ³[406], ⁴[222].

мутаций в 3-5 раз ниже по сравнению с вирусами гриппа А [266, 300]. С начала 1980-х годов попеременно и совместно циркулируют две ветви (линии) вируса гриппа В, существенно

различающиеся по антигенным характеристикам HA и NA и по другим свойствам [300, 465]. Вирусы двух ветвей – «Виктория» и «Ямагата», – прототипами которых соответственно являются штаммы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88, легко вступают в реассортацию. Такие реассортантные штаммы часто выделяются от заболевших [181, 185, 213]. Иммунитет к вирусам гриппа В приобретается в детском возрасте, из-за антигенного дрейфа вирусов он недостаточно прочен.

Вирусы гриппа С эпидемиологического значения не имеют. Они причастны лишь к спорадическим случаям инфекций детского контингента, иногда пожилых лиц, с легким течением. Тем не менее, антитела к вирусу гриппа С присутствуют у 70% людей и обнаруживаются уже в раннем возрасте [281]. Скорость мутаций у вирусов гриппа С низкая, они характеризуются совместной циркуляцией антигенно различающихся штаммов [156].

1.2 СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВИРИОНА, ГЕНОМ И ВИРУССПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Вирусы гриппа А и В сходны по своей структуре (рис. 1.1 А). Вирионы имеют сферическую форму диаметром 80-120 нм, хотя нередко встречаются нитевидные образования до нескольких микрон в длину, особенно среди свежих изолятов [427].

Вирусная частица покрыта липидной бислоевой мембраной. Эта мембрана, как и углеводные компоненты гликопротеинов вируса, заимствуются у клетки хозяина. В липидную оболочку гидрофобным концом погружено примерно 600 шипов двух видов.

Около 500 палочкообразных шипов – гомологичные тримеры гликозилированного белка HA, который функционально ответствен за прикрепление вируса и проникновение его в клетку.

Другие шипы, их приблизительно 100, имеют грибовидную форму и состоят из тетрамеров гликозилированного белка NA, обладающего ферментативной активностью.

В оболочку вируса гриппа А интегрированы также тетрамеры белка M2. Этот белок является минорным компонентом вирусной частицы (20 - 60 молекул белка M2 на вирион, 1 тетрамер M2 на 10-100 структур HA), но играет уникальную роль протонного насоса, обеспечивая условия для депротенизации вируса при проникновении в клетку [обзор 427].

У вирионов гриппа В в оболочку встроены 4 белка: HA, NA, NB и BM2. Тетрамер BM2 образует протонный канал, аналогично белку M2 вируса гриппа А, кроме того он выполняет функцию внутриклеточного транспорта комплекса M1-вРНП к месту сборки вириона [285]. Белок NB также образует ионные каналы, которые важны для репликации вируса в организме, но не участвуют в репликации вируса *in vitro* [264].

Липидную оболочку изнутри выстилает матриксный белок. Это самый большой компонент вирусной частицы – 3000 копий белка М1 на вирион. В матриксном белке заякорены цитоплазматические хвосты белков НА, NA и М2 (ВМ2, NB - у вирусов гриппа В), он является связующим звеном между оболочкой и расположенными внутри вириона структурами ядра: рибонуклеопротеинами (вРНП) и белком ядерного экспорта NEP/NS2 [600].

NEP (nuclear export protein; NS2 – его прежнее название, связанное с ошибочным представлением о неструктурной природе белка) – минорный компонент вирусной частицы, выполняющий несколько биологически важных ролей во время жизненного цикла вируса гриппа. NEP содействует экспорту потомства сегментов вРНК от места синтеза в ядре в цитоплазму и к месту сборки вирусной частицы у клеточной мембраны. В этом процессе NEP действует как связующее звено между комплексом вРНП и экспортным механизмом клеточного ядра [430, 438]. NEP также участвует в регуляции уровня транскрипции и репликации вРНК, осуществляемых вирусными РНК-зависимыми РНК-полимеразами, и в переключении клеточной АТФазы на эффективное почкование вирионов. Было показано, что эта регуляция транскрипции и репликации вирусной РНК с помощью NEP, является важным фактором в адаптации высокопатогенных вирусов птичьего гриппа H5N1 к млекопитающим [443].

В состав каждого из восьми дискретных РНП вирионов гриппа А и В входит сегмент вРНК, представляющий собой ген, упакованный в протеиновый комплекс из нуклеопротеина и РНК-зависимой-РНК-полимеразы (рис. 1.1 В). Вирусная РНК-зависимая-РНК-полимераза состоит из субъединиц щелочных белков РВ2, РВ1 и кислого белка РА. Полимеразный комплекс ответственен за транскрипцию и репликацию вРНК [153]. Для реализации своих основных функций вРНП комплекс способен подстраиваться под разные температурные режимы хозяев при циркуляции вирусов гриппа в млекопитающих и птицах [200, 304, 381].

Вирусы гриппа С имеют семь сегментов вРНП. Обусловлено это с тем, что функции гемагглютинаина и нейраминидазы осуществляет один полифункциональный гликопротеин слияния – гемагглютинин-эстераза (НЕФ). Структурные особенности вируса гриппа С являются причиной того, что его внешний вид отличается от вирусов А и В. Однородные шипы на поверхности вириона организованы в упорядоченные гексагональные структуры [464].

Далее в обзоре акцент сделан на характеристике свойств и репродукции вирусов гриппа А и В, являющихся предметом исследования настоящей работы.

Сегментированная РНК генома вируса гриппа имеет размер 12-15 килобаз. На 5' и 3' концах каждого сегмента вРНК локализованы комплементарные последовательности, из-за чего РНК скручивается в винтовую структуру с петлей на дистальном конце, ее образно сравнивают со «штопором» или «ручкой сковородки» [обзор 427, 512]. Частично комплементарные концы пар оснований функционируют как промотор для транскрипции и репликации вРНК

полимеразным комплексом. Некодируемые участки включают сигнал для полиаденилирования мРНК и фрагмент сигнала для сборки вируса.

Каждый геномный сегмент кодирует один или несколько структурных и неструктурных белков. Вирусные белки формируют структуру вириона и обеспечивают репликацию вируса в клетке хозяина. Структурные белки определяют круг хозяев, тканевой тропизм, эффективность трансмиссивности, антигенные свойства и в большой степени патогенность вируса гриппа. Неструктурные белки присутствуют только в инфицированной клетке, при этом они кодируют факторы вирулентности, которые позволяют вирусу преодолевать защитные механизмы организма хозяина [140, 602]. Характеристика и функции вирусных белков описаны в таблице 1.2.

В структуре вРНК преобладающим является белок NP – около 1000 копий на вирусную частицу, и приблизительно от 30 до 60 копий каждого компонента белков полимераз. NP в вирионе гриппа А организован в тример. С внешней его стороны каждый из мономеров образует глубокий карман, приспособленный для связи с РНК. Связь осуществляется через большое количество остатков оснований на поверхности кармана, которые взаимодействуют с фосфодиэстеразной основой РНК. Расстояние между двумя соседними сайтами связи РНК в молекуле тримера NP соответствует 70 ангстрем, что соразмерно одной молекуле NP на 24 нуклеотида РНК. Кристаллическая структура NP показывает, что он организован в упорядоченную основу, которую обвивает сегмент вРНК. Помимо структурной роли в организации вРНК, NP выполняет важную роль в транскрипции и репликации РНК. Несмотря на высокую консервативность аминокислотной последовательности NP вирусов гриппа А и В, между ними имеются родовые различия. Так, в N-концевой области NP вирусов гриппа В (BNP) присутствует дополнительный консервативный участок из 50 аминокислот. Эта область вовлечена в формирование как гомоолигомеров BNP, так и комплексов BNP-РНК [364, 493]. Кроме того, BNP, в отличие от ANP, формирует тетрамер [422].

NP является мишенью, на которую направлен цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ инфицированного (либо иммунизированного) организма.

Гликопротеины HA и NA оболочки – основные высокоизменчивые антигенные детерминанты вируса, быстрая эволюция которых связана с противостоянием иммунному прессу организма хозяина. Гемагглютинин вызывает индукцию вируснейтрализующих антител. Антитела к NA не нейтрализуют вирус, но препятствуют освобождению вирусного потомства из инфицированных клеток, приводя к снижению репликации и предотвращая распространение инфекции.

Оба белка, HA и NA, распознают одну и ту же молекулу – сиаловую кислоту (N-замещённое производное нейраминовой кислоты) в составе гликопротеинов и гликолипидов

оболочки клетки хозяина. Для инициации вирусной инфекции НА связывается с содержащим сиаловую кислоту рецептором клетки, тогда как NA отщепляет сиаловые кислоты от клеточных рецепторов и ингибиторов, присутствующих в межклеточных секретах.

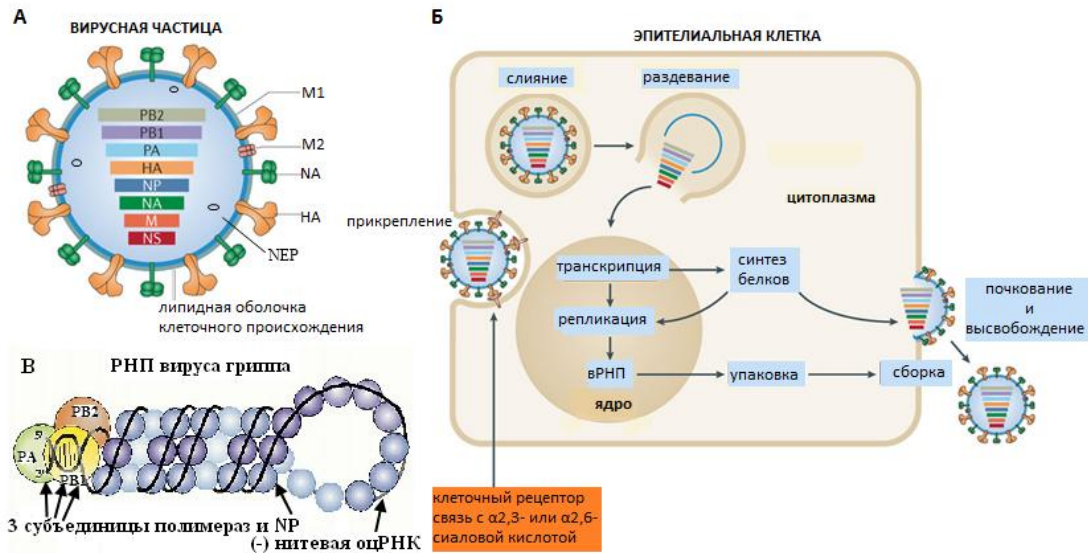


Рисунок 1.1 - (А) Структура вируса гриппа А.
 (Б) Цикл репродукции в инфицированной клетке.
 (В) вРНП. (Адаптирован и модифицирован по [494 и 591]).

В тримере НА имеются структурно различающиеся области: стебель из тройных спиралей и глобулярная головка на его вершине [584]. В углублении головки НА расположен рецепторсвязывающий сайт, состоящий преимущественно из консервативных аминокислот. За счет него обеспечивается присоединение вируса к клеточным рецепторам и последующее слияние мембраны вируса и эндосомы клетки. Рецепторсвязывающий сайт окружен переменными антигенными детерминантами, мутации в которых позволяют вирусу уклоняться от гуморального иммунного ответа хозяина [260]. У вирусов серотипа H3 они обозначаются как A, B, C, D и E, а у вирусов серотипа H1 – как Sa, Sb, Ca1, Ca2 и Cb [150]. У вирусов гриппа В один большой антигенный сайт сформирован пространственно перекрывающимися эпитопами из 120-й, 150-й, 160-й петель и 190-й спирали. Несмотря на низкую гомологию в последовательностях НА вирусов гриппа А и В, составляющую приблизительно 20%, они характеризуются структурным сходством [544].

Вирусный НА содержит N-концевую сигнальную последовательность и C-концевой мембранный якорь. Первоначально НА синтезируется как единый полипептид предшественник (NA0) и объединяется в гомотример. Нативный тример NA0 расщепляется клеточными протеазами на субъединицы NA1 и NA2, удерживаемые дисульфидными связями. N-конец

HA2, который содержит пептид слияния, немного смещается от прежде смежного с ним С-конца HA1. Тример HA1 формирует глобулярную головку, а 3 субъединицы HA2 с частью HA1 входят в состав стебля [506]. В отличие от высокой вариабельности последовательности аминокислот в головке HA, стеблю присуща консервативность структуры у различных штаммов и серотипов вируса. После синтеза и протеолитического расщепления молекула HA подвергается гликозилированию и ацилированию. Гликозилирование происходит в 5-7 сайтах, при этом к HA присоединяются углеводные цепи, количество и позиции которых варьируют у разных штаммов в процессе эволюции возбудителя [228, 522]. При ацилировании к консервативным цистеиновым остаткам, расположенным в трансмембранной С-концевой области HA, присоединяется пальмитиновая кислота, так формируются гидрофобные участки, вовлеченные в закоривание HA в оболочке и концентрирование HA в местах почкования при сборке [174].

Протелитическое расщепление и реорганизация исходного HA0 необходимы вирусу для конформационного перехода в активное для слияния с эндосомой состояние – фактор вирусной инфекционности. [обзор 500]. Слияние вирусной и эндосомальной оболочки инициируется при закислении эндосомы до pH 5-6.

Функции HA, обладающей ферментативной активностью, связаны с отщеплением нейраминной кислоты от смежного с ней остатка сахара в гликопротеиновых комплексах, через которые вирусный HA взаимодействует с клеточными структурами. На этапе проникновения вируса в клетку HA разрушает рецептор, к которому прикрепился HA, способствуя слиянию вирусной и клеточной оболочки [387]. На поздних стадиях инфекции, при почковании, HA предотвращает самоагрегацию вирусных частиц, чем обеспечивает свободный выход вновь синтезированных вирионов из зараженной клетки и их распространение на соседние [232]. Кроме того, при инфицировании, HA способствует продвижению вирусной частицы к клеточным рецепторам, разжижая содержащие нейраминную кислоту муциновые секреты тканей респираторных путей [540].

Мономер HA состоит из цитоплазматической и трансмембранной областей, головки и стебля, связывающего головку с трансмембранной областью. На глобулярной головке находится ферментативный и антигенные сайты молекулы. В вирионах HA формирует гомотетрамер с молекулярной массой 240 кДа из связанных попарно дисульфидными связями субъединиц. Активные сайты расположены в глубокой впадине на внешней поверхности [обзор 498].

Углеводные цепи прикрепляются к аспарагиновым остаткам в различных областях головки HA, варьирующих у разных вирусов гриппа. При этом сайт гликозилирования Asn146

консервативен у всех вирусов гриппа, по-видимому он играет регуляторную функцию, поскольку его отсутствие у A/WSN/33 (H1N1) приводит к нейровирулентности [обзор 498].

Многочисленные исследования последних лет показали, что для эффективной репликации вируса требуется оптимальная взаимосвязь между рецепторсвязывающей и рецепторразрушающей активностью поверхностных гликопротеинов. Существующий у вируса баланс между функциональными антагонистами HA и NA может быть нарушен различными событиями: реассортацией, трансмиссией вируса к новому хозяину, ингибированием нейраминидазы в результате противовирусной терапии. Происходящее в таком случае снижение вирусного репликативного соответствия, как правило, преодолевается восстановлением функционального баланса за счет компенсаторных мутаций в HA, NA или в обоих белках [540].

К настоящему времени известно, что геном вируса гриппа А, помимо 9 структурных белков, способен кодировать не менее 8 неструктурных (табл. 1.2). Сегменты 2 и 3, первичными белковыми продуктами которых являются полимеразные белки PB1 и PA соответственно, дополнительно кодируют белки PB1-F2, PB1-N40 и PA-X. Белки PB1-F2 и PB1-N40 вируса гриппа А и белок NB вируса гриппа В кодируются через перекрывающиеся рамки считывания (PB1-F2 – со сдвигом +1, N40 транслируется через ту же открытую рамку считывания, что и PB1, но инициируется со второго AUG кодона, белок NB – с альтернативной рамки считывания -1). Несплайсированные 7- и 8-ой сегменты мРНК кодируют соответственно белки M1 и NS1, а белки M2 вируса гриппа А и NEP вирусов А и В кодируются сегментами 7 и 8 в результате дифференцированного сплайсинга мРНК [586]. Другие сплайсированные мРНК кодируют недавно выявленный белок M42 и пока не обнаруженные M белки, вероятно участвующие в ранних стадиях инфекции, но несущественные для роста вируса гриппа А в культуре клеток [585]. Белок BM2 вируса гриппа В кодируется сегментом 7 посредством поступательного стоп-старт механизма [292].

Не каждый штамм экспрессирует все выявленные в последние годы неструктурные вирусные белки. Отсутствие этих белков не влияет на жизнеспособность вируса, но может пагубно сказываться на его репликации. Функции недавно обнаруженных неструктурных белков пока недостаточно исследованы. Геномом вируса гриппа В кодируется 11 белков – 10 структурных и неструктурный белок [494]. Благодаря активности белков NS1 и PB1-F2, у вируса гриппа имеются механизмы, позволяющие ему противостоять клеточным факторам противовирусной защиты.

В частности, NS1 является главным антагонистом интерферона, этот белок противодействует и некоторым другим противовирусным факторам клетки, он также принимает участие в регулировании гибели клетки (апоптоза)

Таблица 1.2 - Сегменты РНК вирусов гриппа А и В и кодируемые ими белки

Вирус гриппа А, на примере А/PR8/34				
Сегмент РНК генома	Длина сегмента (н.к. ¹)	Кодируемый белок	Размер мономера белка (а.к. ²)	Функции белков
1	2341	PB2	759	РНК полимеразы/транскриптаза. Распознавание мРНК и связывание «кэп» структур
2	2341	PB1	757	РНК полимеразы/транскриптаза. Элонгация праймера, эндонуклеазная активность
		PB1-F2	87	Регулятор апоптоза [182], интерфероновый ответ [609], фактор вирулентности, регулирует чувствительность хозяина к бактериальной суперинфекции [394]
		N40	718	Вирус-индуцированный патогенез совместно с PB1-F2, слабо изучен [526, 585]
3	2233	PA	716	РНК полимеразы /транскриптаза. Эндонуклеаза, расщепляет мРНК клетки, их кэп-фрагменты становятся затравкой в синтезе мРНК вируса. Сборка полимеразного комплекса
		PA-X	252	Фактор вирулентности. Отключение механизмов функционирования клетки хозяина [293]
4	1778	HA	566	Гемагглютинин. Гликопротеин оболочки. Основной вирусный антиген. Связывание рецептора клетки, активатор слияния
5	1565	NP	498	Нуклеопротеин. Структурная связь с РНК, часть транскриптазного комплекса. Ядерный и цитоплазматический транспорт вРНК
6	1413	NA	454	Нейраминидаза. Гликопротеин оболочки с ферментативной активностью. Второй по значимости вирусный антиген. Функциональный баланс с HA [540]. Освобождение вируса из инфицированной клетки при почковании, отщепление от рецепторов, помощь в прохождении через секреты слизистых ВДП
7	1027	M1	252	Матриксный белок. Основной структурный компонент вириона, взаимодействует с ядром: вРНП и NEP и белками оболочки. Основная регулирующая роль при сборке и почковании вируса [414]
		M2	97	Интегрированный в мембрану белок. Тетрамеры образуют протонный канал, осуществляющий важную роль в раздевании вириона. Участвует в сборке, почковании и морфогенезе. Транспорт комплекса M1-вРНП к месту сборки вириона [285]
8	890	NS1	230	Неструктурный белок ядерной локализации. Фактор патогенности: выступает регулятором функций клетки-хозяина и вируса: ингибирует сплайсинг, трансляцию и транспорт клеточных мРНК, антагонист интерферона и активности продуцирующих интерферон генов [285]
		NEP/NS2	121	Белок ядерного экспорта [438]. Транспорт вирусных РНК из ядра в цитоплазму [430], регулирование синтеза вРНК, кРНК и мРНК, переключение клеточной АТФазы на эффективное почкование вирионов [443]

Таблица 1.2 (продолжение)

Вирус гриппа В, на примере В/Ли/40				
Сегмент РНК генома	Длина сегмента (н.о. ¹)	Кодируемый белок	Размер мономера белка (а.о. ²)	Функции белков
1	2369	PВ2	770	РНК полимеразы/транскриптаза. Распознавание мРНК и связывание «кэп»-структур
2	2368	PВ1	752	РНК полимеразы/транскриптаза. Элонгация праймера, эндонуклеазная активность
3	2245 ³	РА	726	РНК полимеразы /транскриптаза. Эндонуклеаза, расщепляет мРНК клетки, их кэп-фрагменты становятся затравкой в синтезе мРНК вируса. Сборка полимеразного комплекса
4	1882	НА	584	Гликопротеин оболочки. Основной вирусный антиген. Связывание рецептора клетки, активатор слияния
5	1841	NP	560	Нуклеопротеин. Структурная связь с РНК, часть транскриптазного комплекса. Ядерный и цитоплазматический транспорт вРНК
6	1557	NA	486	Нейраминидаза. Гликопротеин оболочки с ферментативной активностью. Второй по значимости вирусный антиген. Функционирует в балансе с НА [540]. Освобождение вируса из инфицированной клетки при почковании, отщепление от рецепторов, помощь в прохождении через секреты слизистых ВДП
		NB	100	Интегрированный в мембрану белок; ионный канал [264]
7	1180 ³	M1	248	Матриксный белок. Основной структурный компонент вириона, взаимодействует с ядром: вРНП и Nер и белками оболочки. Основная регулирующая роль при сборке и почковании вируса [414]
		BM2	109	Интегрированный в мембрану белок. Тетрамеры образуют протонный канал, осуществляющий важную роль в раздвигании вириона. Участвует в сборке, почковании и морфогенезе. Транспорт комплекса M1-вРНП к месту сборки вириона [285]
8	1096	NS1	281	Неструктурный белок ядерной локализации. Фактор патогенности: выступает регулятором функций клетки-хозяина и вируса: ингибирует сплайсинг, трансляцию и транспорт клеточных мРНК, антагонист интерферона и активности продуцирующих интерферон генов [285]
		NEP/NS2	122	Белок ядерного экспорта [438]. Транспорт комплексов вирусных РНП из ядра в цитоплазму [430], регулирование синтеза вРНК, кРНК и мРНК, переключение клеточной АТФазы на эффективное почкование вирионов [438, 443]

¹Нуклеотидные основания. ²Аминокислотные остатки. ³Сегмент генома вируса В/Мемфис/12/97.

Белок PB1-F2 присутствует у большинства, но не у всех вирусов гриппа А. Является коротким белком, его длина варьирует у разных вирусов от 55 до 90 аминокислот, а у преобладающего большинства изолятов вируса H1N1pdm2009 урезанный белок PB-F2 состоит всего из 11 аминокислот. Белок PB1-F2 дестабилизирует мембраны митохондрий за счет образования в них пор, что приводит к утечке макромолекул и завершается апоптозом [173, 182, 269, 609]. PB1-F2 также оказывает влияние на активность полимеразного комплекса, взаимодействуя с белком PB1 [193]. Все результаты активности белка PB1-F2 сводятся к повышению патогенности вируса.

1.3 РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

Для реализации функций воспроизводства, вследствие небольших собственных возможностей кодирования, вирус гриппа использует разные стратегии: помимо синтеза нескольких полипептидов с одного сегмента геномной РНК, вирус узурпирует и модифицирует репликативный аппарата клетки-хозяина, кроме того, ряд вирусных белков обладает полифункциональными свойствами [обзоры 415, 427].

Проникновение в клетку. Начальным этапом цикла репродукции является адсорбция вируса на поверхности клетки хозяина (рис. 1.1 Б). Вирус гриппа в качестве рецептора распознает N-ацетилнейраминовую (сиаловую) кислоту в клеточной оболочке. Сиаловые кислоты представляют собой моносахариды из девяти углеродов, находящиеся на конце многих гликоконъюгатов. Они широко распространены в разных типах клеток животных. Второй углерод в терминальной сиаловой кислоте может связываться либо с третьим, либо с шестым углеродом галактозы, образуя соответственно Sia α -2,3Gal (α -2,3) либо Sia α -2,6Gal (α -2,6) связи. Различия в способе связывания приводят к уникальным стерическим конфигурациям терминальной сиаловой кислоты. Эти группы сиаловых кислот распознаются рецепторсвязывающими сайтами НА вирусов гриппа, которые имеют специфичность к α -2,3- или к α -2,6-связи. Вирусы гриппа А человека в качестве клеточных рецепторов распознают гликопротеины, содержащие сиаловые кислоты, связанные с галактозой посредством α -2,6-связи [194, 229, 385, 460]. Такие сиалил-содержащие рецепторы преобладают на эпителиальных клетках верхних дыхательных путей человека [15, 195, 387, 495]. Вирусы гриппа птиц и лошадей преимущественно связываются с α -2,3 рецепторами [194, 229, 385, 460], которые, в частности, преобладают на эпителиальных клетках кишечника утки [12, 386, 524, 591]. А вирусы гриппа свиней проявляют сродство к обоим типам рецепторов [552]. Эти различия в рецепторной специфичности НА являются критической детерминантой круга хозяев вирусов гриппа [обзор 150, 583]. Что касается вирусов гриппа В, практически эндемичных для человека,

то недавно стало известно, что вирусы ветви «Ямагата» имеют преимущественное сродство к рецепторам с α -2,6-связью, тогда как вирусы ветви «Виктория» способны связываться с рецепторами обоих типов – с α -2,6- и α -2,3-связью; кроме того, для их представителей специфичен третий вид рецепторов – сульфатированные гликопротеины [546].

Эндоцитоз и внутриклеточная миграция вирусосодержащих эндосом. Посредством флуоресцентной микроскопии удалось проследить в реальном времени проникновение вируса гриппа в клетку [332]. Когда вирус гриппа прикрепляется к плазматической мембране, он индуцирует образование покрытых кларитином углублений, которые оформляются в эндосомы. Внутриклеточный транспорт содержащих вирус эндосом проходит в три стадии. Первая стадия – медленное перемещение эндосом с вирусом на периферию клетки. Во второй стадии эндосомы с вирусом быстро движутся к клеточному ядру. В течение третьей стадии вирус передвигается вперед и назад по тому же пути в околядерной области. Высказано предположение, что в результате такого перемещения формируется эндоцитозный «коридор», организующий разнонаправленные вирусспецифические двигательные действия. Финальной стадией этого процесса является слияние вирусной оболочки с мембраной эндосомы.

Слияние совершается в перинуклеарной области, здесь же, за счет действия протонного насоса, происходит закисление эндосомы. В эндосоме, при низком значении pH, HA подвергается необратимым конформационным изменениям, в результате которых освобождается «пептид слияния» на N-конце субъединицы HA2. Он получает возможность встраиваться в эндосомальную мембрану, чем индуцирует ее слияние с вирусной мембраной [500].

Через ионный канал, образованный вирусным белком M2 (M2), происходит приток протонов внутрь вирусной частицы, она также закисляется. Это приводит к диссоциации вирусных vRNP комплексов с матричного белка в цитоплазму и их транспортировке в ядро клетки [380]. В этом процессе задействуются клеточные факторы ядерного импорта импортин- α и импортин- β [199]. Белок M1 независимо импортируется в ядро [380]. *Транскрипция и репликация вирусного генома.* В отличие от большинства других РНК-содержащих вирусов у ортомиксовирусов синтез всех вирусспецифических РНК происходит в ядре инфицированной клетки. Катализатором процесса служит полимеразный комплекс вируса из трех субъединиц PB2, PB1 и PA. Вирусная РНК служит матрицей для синтеза кРНК (комплементарной) и мРНК (матричной).

Репликация вирусной РНК осуществляется посредством двухэтапного процесса: начинается с синтеза комплементарной кРНК, которая является (+) смысловой копией vРНК. Далее, кРНК многократно копируется и служит матрицей для синтеза большого количества дочерних vРНК [обзор 390, 419].

Транскрипция вРНК инициируется связыванием белка PB2 с кэп-структурой клеточных мРНК. Кэп-структуры срабатывают как праймер для синтеза мРНК. Синтез мРНК вируса осуществляется при участии белка PB1. Транскрипция проходит до тех пор, пока работа полимеразного комплекса не замирает на сигнальном полиаденилированном участке в конце вирусной РНК [358].

Трансляция. Синтезированные вирусные мРНК экспортируются из ядра в цитоплазму, где происходит трансляция вирусспецифических белков, при этом клеточные механизмы трансляции перенастраиваются на цели инфекционного агента [148, 599]. Мономер белка НА синтезируется как полипептид предшественник – НА0. Синтезированные белки полимеразного комплекса – NP, PB2, PB1 и PA – импортируются в ядро с помощью собственных сигналов ядерной локализации [390]. В ядре они катализируют транскрипцию и репликацию вРНК. В ядро направляются также белки M1, NEP и NS1 для выполнения своей роли в экспорте из ядра вРНК (M1 и NEP) или процессинга и экспорта клеточной и вирусной мРНК (NS1) [обзор 390, 486].

Экспорт вРНК. Для экспорта вновь синтезированных комплектов вРНК вирусные белки NEP и M1 работают во взаимодействии с белками клетки, которые образуют «мостик» между вРНП и NEP, и создают ассоциацию между белком M1 и вРНК [обзор 390].

Пост-трансляционные модификации. После синтеза в цитоплазме белки НА, NA и M2 поступают на эндоплазматический ретикулум, где НА0 собирается в тример, НА и NA гликозилируются, а также НА и M2 S-ацилируются. Белки M1, NS1, NP, PB1 и NEP конъюгируют с маленьким модификатором (SUMOylation). Осуществляется фосфорилирование белков M1 и NP, что может влиять на ядерный импорт и экспорт вРНК, и фосфорилирование белков NS1 и PB1-F2, влияющее на вирулентность. Все эти процессы катализируются клеточными киназами [обзор 390]. Через трансмембранную сеть Гольджи тример НА экспортируется на поверхность клетки, где клеточными протеазами осуществляется расщепление белка НА на дисульфидно-связанные субъединицы НА1 и НА2. Белок НА у высоковирулентных вирусов гриппа птиц сероподтипа H5 и H7 обладает несколькими основными аминокислотами в кливедж сайте НА, чем отличается от вирусов человека и непатогенных вирусов птиц, у которых в кливедж сайте НА одна основная аминокислота – аргинин [282, 553].

Транспортировка вирусных белков к плазматической мембране выполняется за счет факторов клетки.

Упаковка и почкование. В плазматической мембране НА и NA связывается с липидными плотиками (области мембраны, богатые сфинголипидами и холестерином), которые становятся местом почкования вируса гриппа [485]. Белок M1 вовлекается в процессы сборки вируса – он

взаимодействует с липидной мембраной, vРНК и NEP [199, 414, 481, 600]. Во встраивании vРНК в вирусную частицу, возможно, участвует также цитоплазматический хвост белка M2 [395].

При сборке в составе дочерних вирионов всегда оказывается полный комплект из восьми РНП и отсутствуют дубликаты, что свидетельствует о существовании сегмент-специфического сигнала для упаковки. Однако механизмы регуляции сборки пока не достаточно изучены [226, 284, 426, 512].

Вирусный белок NA отщепляет сиаловые кислоты от оболочки клетки-хозяина и от гликопротеинов NA вирионов. Дочерние вирусные частицы освобождаются и способны инфицировать соседние клетки [обзор: 390].

ГЛАВА 2 ЭКОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА

2.1 ЭКОЛОГИЯ ВИРУСОВ ГРИППА: «ЕДИНЫЙ МИР – ОБЩАЯ УГРОЗА»

Вирусы гриппа А представляют серьезную угрозу для здоровья человека и многих видов теплокровных животных (рис. 2.1) [172, 524].

Дикие мигрирующие водоплавающие птицы и кулики являются природным резервуаром вирусов гриппа А. В их среде циркулирует множество вирусов, относящихся к 16-ти сероподтипам HA (H1–H16) и 9-ти сероподтипам NA (N1–N9) [223, 429, 554]. Существование большого числа разных комбинаций HA-NA без их генетической привязки к другим сегментам генома свидетельствует о том, что смешанные инфекции и реассортация вирусов гриппа у диких птиц – явление заурядное. Для диких водоплавающих птиц вирусы гриппа собственного резервуара чаще всего низковирулентны (LPAI, low pathogenic avian influenza). Они передаются фекально-оральным путем через контаминированную воду и инфицируют эпителиальные клетки нижнего отдела кишечника птиц с развитием бессимптомной или легкой инфекции [524, 556].

Птичий резервуар играет ключевую роль в происхождении новых вирусов гриппа. Вирусы диких птиц способны преодолевать межвидовой барьер и вызывать транзиторные зоонозные инфекции у сухопутных птиц и млекопитающих. В редких случаях вирусы адаптируются к новым хозяевам и формируют у них собственные линии вирусов [439, 496]. Экологические изыскания и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов вирусов гриппа А разных сероподтипов, выделенных от различных хозяев в разных регионах, подтверждает гипотезу о том, что все вирусы гриппа млекопитающих произошли из резервуара вирусов гриппа птиц. Генетическая взаимосвязь между вирусами гриппа человека и свиней также свидетельствует об их эволюции от общего птичьего предшественника [234, 555].

Трансмиссивность вирусов от мигрирующих водоплавающих птиц другим видам обычно является следствием мутаций и реассортаций [420, 552]. В исключительных случаях низковирулентные для диких птиц вирусы вместе с мутациями могут приобрести высокую вирулентность (HPAI, highly pathogenic avian influenza) для других видов диких и домашних птиц и млекопитающих. Вспышки заболеваемости, вызванной HPAI вирусами, приводят к массовой гибели кур и огромному урону в птицеводстве [267]. Высоковирулентные вирусы гриппа птиц H5N1, впервые заявившие о себе в 1997 году массовой гибелью диких и домашних птиц [421], к настоящему времени стали источником эпизоотий в 60 странах трех континентов [295, 357, 517]. Это привело к десяткам миллионов птичьих смертей, инфекциям и смертности среди некоторых видов млекопитающих, включая человека [557].

Из обширного генофонда вирусов гриппа птиц стабильно адаптированные к млекопитающим линии до сих пор сформировали только четыре сероподтипа: H1, H2 и H3 – к людям и к свиньям, H7 и H3 – к лошадям, H3 – к собакам [524, 610].

Данные последних лет свидетельствуют о том, что список восприимчивых к вирусам гриппа животных значительно шире, а пути межвидовой передачи сложнее, чем представлялось раньше. Обнаружено, что нечеловеческие приматы естественным путем инфицируются сезонными вирусами гриппа человека [301]. Установлены случаи заражения домашних кошек, тигров, леопардов HPAI вирусами гриппа птиц H5N1 [307, 328, 505]. Отмечены прецеденты инфицирования норок фермерских хозяйств вирусами гриппа птиц, свиней, людей и случаи интерстициальной пневмонии, спровоцированные у них вирусом птиц H10N4 [217, 446]. Уникальные мутации в молекуле гемагглютинаина привели к эволюции вируса лошадей H3N8 в вирус собачьего гриппа, с развитием у нового хозяина тяжелых форм респираторного заболевания [198]. Собственная линия вирусов гриппа птиц H11N2 выявлена у антарктических пингвинов [283].

Особая роль в возникновении новых вирусов гриппа принадлежит свиньям. Собственные вирусы гриппа свиней чаще всего приводят к бессимптомным инфекциям респираторного тракта у своих хозяев. Периодически свиньям передаются и успешно в них репродуцируются вирусы гриппа птиц, низших млекопитающих, человека. Такая восприимчивость к вирусам гриппа разных хозяев обусловлена наличием в клетках дыхательных путей свиней рецепторов обоих типов: Sia α -2,6Gal и Sia α -2,3Gal. Свиней образно называют «перемешивающим сосудом», поскольку циркуляция в их популяции вирусов разных хозяев сопровождается обменом генами, мутациями, либо комплексом этих процессов [420, 488, 545, 552]. Следствием подобных событий может стать появление новых возбудителей, в частности возбудителей человека, способных вызвать крупные эпидемии и глобальные пандемии [616]. Требуется пристального внимания и бессимптомная циркуляция свиных вирусов гриппа. Так, генетический анализ вирусов, выделенных от свиней в Гонконге, показал, что предшественник пандемического вируса H1N1 2009 года циркулировал в свиньях за 9-17 лет до пандемии [503]. Периодически вирусы гриппа свиней становились причастны к спорадическим заболеваниям человека при его близком контакте со свиньями. Чаще всего эти заболевания не отличались тяжестью, и трансмиссия от человека к человеку была ограниченной. Однако серьезные заболевания возможны.

Существенно, что люди могут передать свиньям даже больше вирусов, чем свиньи людям. В частности, было показано, что вирус A(H1N1)pdm2009 после пандемии циркулирует у свиней

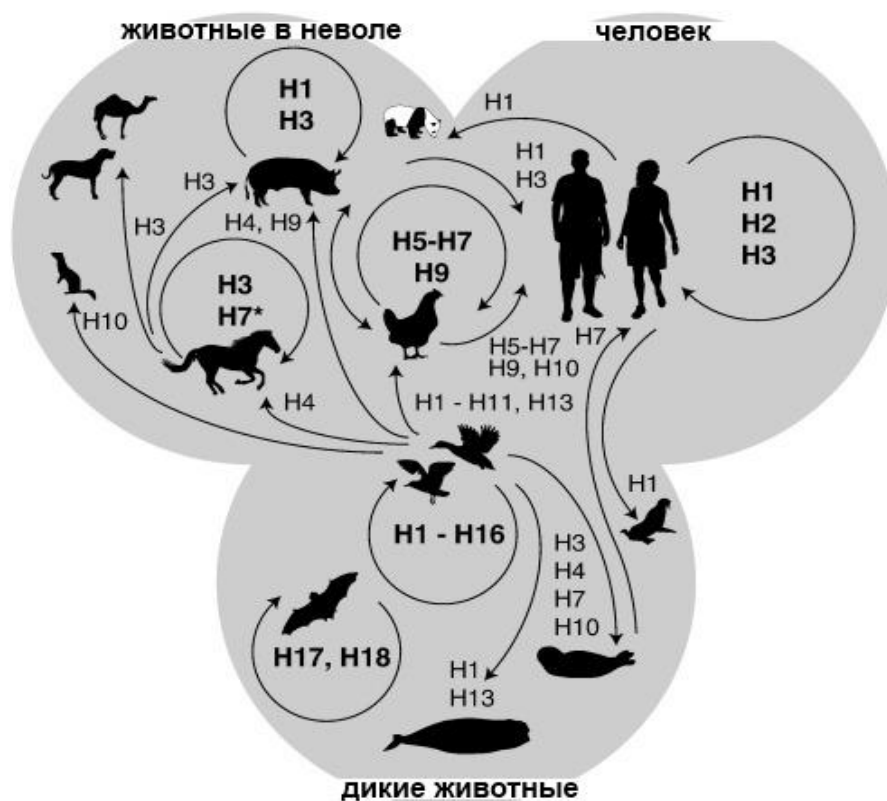


Рисунок 2.1 - Резервуары низкопатогенных вирусов птичьего гриппа и события их межвидовой трансмиссии

(дикие птицы, домашние птицы, свиньи, лошади, люди и летучие мыши поддерживают собственные вирусы гриппа А (стрелки круговые, сероподтип выделен жирным шрифтом). Побочные события трансмиссии происходят эпизодически, чаще всего от диких птиц (стрелки прямые, сероподтип отмечен обычным шрифтом). *Вирус H7N7 появился у лошадей в 1950-х годах, но в настоящее время, как полагают, не циркулирует. [496].

в Западной Африке [131]. Реассортация вирусов человека и свиньи может привести к появлению патогенов, представляющих серьезную опасность для обоих хозяев.

Концентрация усилий на значительном уменьшении трансмиссивности вирусов гриппа от человека и животных свиньям, и надзор за резервуарами вирусов гриппа свиней и диких птиц позволит помочь определить, какой из множества вирусов гриппа имеет потенциал для трансмиссивности людям и возникновения пандемии [401, 416].

В отличие от широко распространенных в природе вирусов гриппа А, первичным хозяином и резервуаром вирусов гриппа В и С является человек [292]. Тем не менее факты демонстрируют, что вирусы гриппа В и С все же способны передаваться от людей другим биологическим видам [240, 354, 432]. Есть свидетельства о циркуляции вируса гриппа С среди свиней в Китае [255]. Серологические исследования в Японии и Великобритании подтверждают, что 9,9% - 19% свиней имеют антитела к вирусу гриппа С [155, 596].

Установлены случаи обратной зоонозной трансмиссии вирусов гриппа, как А, так и В, тюленям после вспышек у человека. С 1995 года от 0,5 до 2% тюленей перенесли инфекцию, вызванную вирусом гриппа В, циркулировавшим 4-5 лет назад у людей [428, 432]. Антитела к вирусам гриппа А (Н1, Н3, Н5) и В выявлены у содержащихся на фермах в Эквадоре морских свинок [354]. Является ли это результатом адаптации вирусов гриппа В к новому хозяину, или свинки представляют транзитный резервуар вирусов гриппа человека пока не ясно.

Помимо расширения знаний об экологии возбудителя, в последние годы открытием стали находки неизвестных ранее вирусов гриппа в новых природных резервуарах.

В Гватемале был обнаружен новый круг хозяев вирусов гриппа А – два вида летучих мышей отряда рукокрылых. Из их ректальных смывов выделены вирусы гриппа А неизвестных ранее серотипов NA и NA (Н17N10 и Н18N11) [393, 528, 529, 530]. Пока вирусы летучих мышей не были обнаружены у других видов млекопитающих. Однако, они имеют потенциал стать реальной угрозой для человека из-за сходства репликативных комплексов вирусов рукокрылых и других вирусов гриппа А, что может оказаться благоприятным фактором для образования межвидовых реассортантов и межвидовой трансмиссивности [450].

Недавним открытием стало выделение возбудителей респираторного заболевания крупного рогатого скота, отдаленно родственных вирусу гриппа С. К вирусу восприимчивы также свиньи, овцы и козы. Рассматривается обоснованность включения этих вирусов в новый род *Influenzavirus D* [186, 265].

Несомненно, что за таким огромным естественным резервуаром, как летучие мыши, популяция которых составляет приблизительно 20% всех известных млекопитающих, а также за вирусами гриппа D, резервуаром которых является ближайший сосед человека – крупный рогатый скот, необходим мониторинг [186, 360].

Представленные данные свидетельствуют о том, что генетические элементы вирусов гриппа циркулируют и эволюционируют глобально в обширных экосистемах, включающих разных хозяев и различающихся по окружающим условиям. Конstellляции генов вирусов гриппа А, оказавшиеся нестабильными у птиц, могут стать стабильными при переключении на вторичного хозяина, к которым они могут адаптироваться и затем циркулировать независимо.

Единство мира вирусов гриппа животных и человека убеждает в исключительном значении надзора за их распространением в биосфере для понимания механизмов возникновения и возможных путей эволюции вирусов гриппа человека.

2.2 ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА

Вирусы гриппа уникальны во многих своих проявлениях: в способности инфицировать множество видов хозяев, в способности к эволюции, преодолению межвидового барьера, адаптации к новому сообществу с репродукцией и распространением в нем, уникальны по частоте происходящих событий межвидовой передачи. Все эти особенности реализуются в результате чрезвычайно высокой генетической изменчивости вирусов.

2.2.1 ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА

Сходство структурных черт и организации генома вирусов гриппа А, В и С свидетельствуют об их общей родословной. Математическая модель, созданная для оценки происхождения и эволюции вирусного гемагглютинина, доказывает, что хорошо адаптированный к человеческой популяции слабовирулентный вирус гриппа С является самым древним, он возник на 4000 лет раньше вируса гриппа В и на 8000 лет раньше вируса гриппа А. Скорость эволюции вирусов гриппа В и С ниже, чем у более молодого вируса гриппа А. Дивергенция вируса гриппа А на сероподтипы могла произойти приблизительно 2000 лет назад [516].

Эволюционно адаптированный к хозяину вирус сосуществует с ним в относительном динамическом равновесии, при котором не происходит гибели или тяжелой заболеваемости. О хорошей приспособленности вирусов гриппа А диких водоплавающих птиц к своему природному резервуару свидетельствует минимальная аминокислотная изменчивость белков и низкая вирулентность [557]. Из-за короткого жизненного цикла птиц и апатогенности птичьих вирусов они не подвержены антигенной изменчивости. Однако межвидовая передача вирусов гриппа А сопровождается антигенной и генетической эволюцией. При этом непатогенные вирусы птиц за счет приобретения адаптационных мутаций или реассортации с другими вирусами гриппа и могут стать высоковирулентными для нового хозяина. Следствием таких событий являются вспышки заболеваний у домашних и диких сухопутных птиц, млекопитающих животных и людей. Подобные события описаны, в частности, для вирусов сероподтипов H5 и H7 [603]. Многочисленные аминокислотные замены во всех белках вирусов млекопитающих и сухопутных птиц являются подтверждением того, что оптимальной адаптации вирусов гриппа А к этим видам не произошло [489, 581].

Сравнительный анализ большой коллекции полногеномных сиквенсов вирусов гриппа А человека обнаруживает множественные точечные мутации и делеции в генах, кодирующих белки оболочки и внутренние белки, а также замещения генов целиком вследствие реассортации [241]. Постоянная эволюция возбудителей гриппа человека связана с

меняющимися взаимоотношениями с хозяином, которые обусловлены генетикой вируса, факторами клетки, окружающей среды и социальными факторами. Вирусы гриппа в инфицированном организме сталкиваются с врожденным и адаптивным иммунным прессом, что активизирует обновление вирусных антигенных детерминант. Изменения также могут происходить на фоне использования химиопрепаратов и вакцин.

Двумя основными причинами генетического разнообразия, способствующего быстрой эволюции вирусов гриппа, являются (1) мутации, с высокой частотой возникающие в геноме, и (2) генетическая реассортация сегментов генома разных вирусов гриппа.

(1). Неконтролируемое накопление мутаций при репликации обусловлено частыми ошибками в работе вирусной РНК-полимеразы, поскольку вирус гриппа, как минус-нитевой РНК-содержащий вирус, кодируется комплексом РНК-зависимых РНК-полимераз, в котором отсутствует функция корректуры и редактирования. Число ошибочных вставок в нуклеотидных позициях составляет примерно 10^{-4} - 10^{-5} на реплицирующийся геном, что соответствует примерно одному измененному нуклеотиду в каждом цикле репродукции [442, 501]. В условиях иммунологического пресса, когда численность устойчивой популяции вируса снижается, давление вредных мутаций, вероятно, становится острой проблемой для вирусов гриппа, что усиливает значение генетического дрейфа. Большая часть возникающих мутантов и реассортантов вируса менее жизнеспособны, чем родительские штаммы. Если же спонтанные мутации обеспечивают вирусу селективные преимущества, то они закрепляются, и мутанты становятся преобладающими в вирусном потомстве [154, 279]. Эволюция генов происходит по принципу эпистатического взаимодействия, когда дестабилизирующие недопустимые, но имеющие адаптивную ценность мутации поддерживаются за счет дополнительных компенсаторных мутаций [247].

(2). Фрагментированность вирионной РНК, где каждый дискретный фрагмент представляет собой ген, способствует реассортации сегментов генома при инфицировании клетки двумя и более штаммами [315]. Сегментированный наследственный аппарат обеспечивает вирусу эволюционные преимущества, которые заключаются в реконструировании свободного от ошибок генома за счет возможности отбора полноценно скопированных сегментов из скопированных с ошибками (отбор может происходить при сборке вирусной частицы или в результате множественной реактивации) и в приобретении благоприятных аллелей. Частота событий реассортации зависит от дозы инфицирующих вирусов, времени инфицирования и совместимости фрагментов генома [412]. При одновременном попадании в чувствительную клетку 10^6 БОЕ двух вирусов от 46% до 86% вирусного потомства представляют собой реассортанты [379]. Обмен сегментами в РНК теоретически может приводить к образованию 2^8+2 вариантов вирусного потомства и ограничивается лишь

функциональной несовместимостью генетических компонентов, что в отдельных случаях происходит при совместном инфицировании вирусами разных хозяев [236, 356, 510]. Сегменты геномов циркулирующих у человека серотипов вирусов гриппа А, также как и вирусов гриппа В эволюционных линий «Виктория» и «Ямагата», полностью совместимы, поэтому реассортантные вирусы гриппа А и В являются частыми участниками эпидемического процесса [181, 213].

Реассортация – фундаментальный фактор эволюции вирусов гриппа, играющий ключевую роль в образовании эпидемически значимых штаммов и в увеличении разнообразия циркулирующих вирусов гриппа. Сегментированный геном играет существенную роль как в эволюции вирусов гриппа в пределах одного биологического вида, так и в содействии скачку к новому виду хозяев [144, 284].

2.2.2 АНТИГЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА: ШИФТ И ДРЕЙФ

Антигенно обновленные вирусы приобретают потенциал распространяться в восприимчивой популяции в качестве возбудителей эпидемий и пандемий. Два процесса определяют антигенную эволюцию вирусов гриппа – это шифт и дрейф.

Шифт (антигенный сдвиг) – появление абсолютно нового, незнакомого популяции, антигенного варианта вируса гриппа, или возврат в популяцию вируса с неизвестным иммунной системе живущего поколения людей серотипом НА [238, 503, 554]. Внедрение в человеческую популяцию нового НА зоонозного происхождения обусловлено двумя механизмами, которые не являются взаимоисключающими: реассортации вирусов человека и животных и прямой межвидовой трансмиссии. Шифту подвержены только вирусы гриппа А, широко циркулирующие в природе среди разных биологических видов. Тесный контакт диких и домашних водоплавающих птиц, животных и людей, рынки продажи сельскохозяйственных животных способствуют передаче и реассортации вирусов [401, 497, 556]. Результатом распространения нового штамма вируса гриппа в иммунологически наивной популяции может быть возникновение пандемии – эпидемии планетарного масштаба.

Существуют две гипотезы возникновения пандемий гриппа – цикличная и спиральная [497]. Согласно цикличной гипотезе смена гемагглютининов ограничивается тремя серотипами, вызвавшими все известные к настоящему времени пандемии: Н1, Н2 и Н3, тем самым подразумевая, что причиной следующей пандемии станет повторное появление вируса, который вызывал эпидемии много лет назад. Смена гемагглютининов по спирали подразумевает, что причиной пандемии могут стать вирусы разнообразных серотипов НА, циркулирующие у животных.

Глобальному распространению нового вируса в современном мире способствует ускорение научно-технического прогресса с развитием скоростных транспортных средств, международных контактов, увеличение миграции.

За закреплением в популяции человека «шифтового» вируса гриппа следует его длительная антигенная эволюция – дрейф [436, 458]. Дрейфу подвержены как вирусы гриппа А, так и В. Антигенный дрейф обусловлен постепенным накоплением точечных мутаций в антиген-презентирующих сайтах HA и NA начального возбудителя, приводящих к способности вируса избегать нейтрализующего действия иммунной системы организма. В процессе дрейфа HA приобретает дополнительные сайты гликозилирования. У современных вирусов H3N2 имеется 11 потенциальных сайтов гликозилирования [266], тогда как у родоначальника пандемии «Гонконгского» гриппа таких сайтов было всего два [522]. Возбудитель «испанки» H1N1pdm1918 имел только один сайт гликозилирования 104-Asn, а вирусы этого пандемического цикла в 1950-х годах характеризовались уже 4-5-ю сайтами [558]. Такой же единственный сайт гликозилирования 104-Asn был специфичен для вирусов H1N1pdm2009, позднее выявлено несколько вариантов с изменениями в гликозилировании HA [513]. Цепочки гликанов могут экранировать антигенные центры и RBS и таким образом способствовать уклонению вируса от действия специфических антител и неспецифических ингибиторов в слизистых секретах [230, 522].

2.2.2.1 Пандемии гриппа. О глобальных эпидемиях, сходных по описанию с гриппом, известно по меньшей мере пять веков [401]. За последние 100 лет человечество столкнулось с четырьмя пандемиями гриппа, которые возникали с интервалами от 10 до 40 лет. Возбудителями известных пандемий были вирусы гриппа А H1N1, H2N2 и H3N2 с гемагглютинином и нейраминидазой зоонозного происхождения (рис. 2.3). Тяжесть пандемий варьировала от умеренной до катастрофической.

Установлено, что все пандемии 20-21 века произошли в результате трансмиссии зоонозных вирусов людям. Пандемические вирусы гриппа возникали либо как следствие прямой адаптации вируса птиц к человеку (таково, по-видимому, происхождение вируса H1N1 –

возбудителя «испанки» 1918 года [457, 523], либо в результате реассортации вирусов гриппа человека, птиц, свиней с наследованием зоонозных HA и NA; так произошли возбудители пандемий 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) и 2009 (H1N1pdm) годов (рис. 2.4 А, Б) [238, 306, 362, 420].

Пандемия «испанки» А (H1N1)pdm1918. Наиболее беспрецедентная по тяжести пандемия произошла в 1918/1919 году [420]. Она убила по разным оценкам от 40 до 50 миллионов

человек и вызвала огромное число тяжелых форм заболевания. Переболело 30% населения планеты [225].

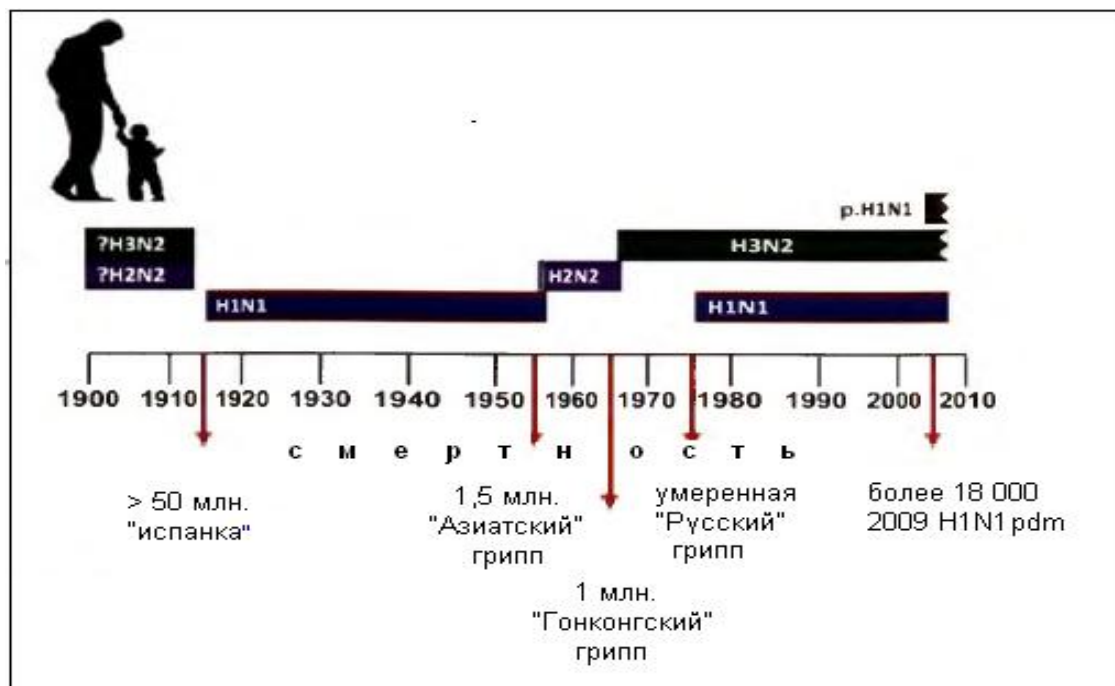


Рисунок 2.3 – Пандемии гриппа 20 – начала 21-го века

Линия времени показывает возникновение пандемии гриппа, период эпидемической циркуляции дрейфовых штаммов, и смертность от пандемического вируса (По материалам: [401]).

Картина заболеваемости «испанским» гриппом характеризовалась необычно высокими показателями смертности среди молодых взрослых людей. При этом структура заболеваемости была похожа на другие пандемии – самому высокому риску были подвержены дети в возрасте до 15 лет. Вирус «испанки» ограничивался поражением респираторного тракта [324]. Большинство больных умерли от бактериальной пневмонии, что может быть отнесено за счет отсутствия антибиотиков в тот период, однако, многие также погибли от вирусной пневмонии. Несмотря на то, что вирус во время пандемии выделен не был, его удалось секвенировать, благодаря использованию генетического материала сохранившихся в вечной мерзлоте жертв пандемии, и воссоздать методами обратной генетики [418, 457]. Было установлено, что возбудителем пандемии стал вирус H1N1 подобный птичьему, с аминокислотными метками вируса гриппа человека в нескольких белках [523].

Пандемия «Азиатского» гриппа А (H2N2)pdm1957. Вирус «Азиатского» гриппа возник в Южном Китае в феврале 1957 года и вызвал две волны пандемии в 1957 и 1958 годах. Возбудителем пандемии стал реассортантный вирус А/Сингапур/1/57, возникший в результате

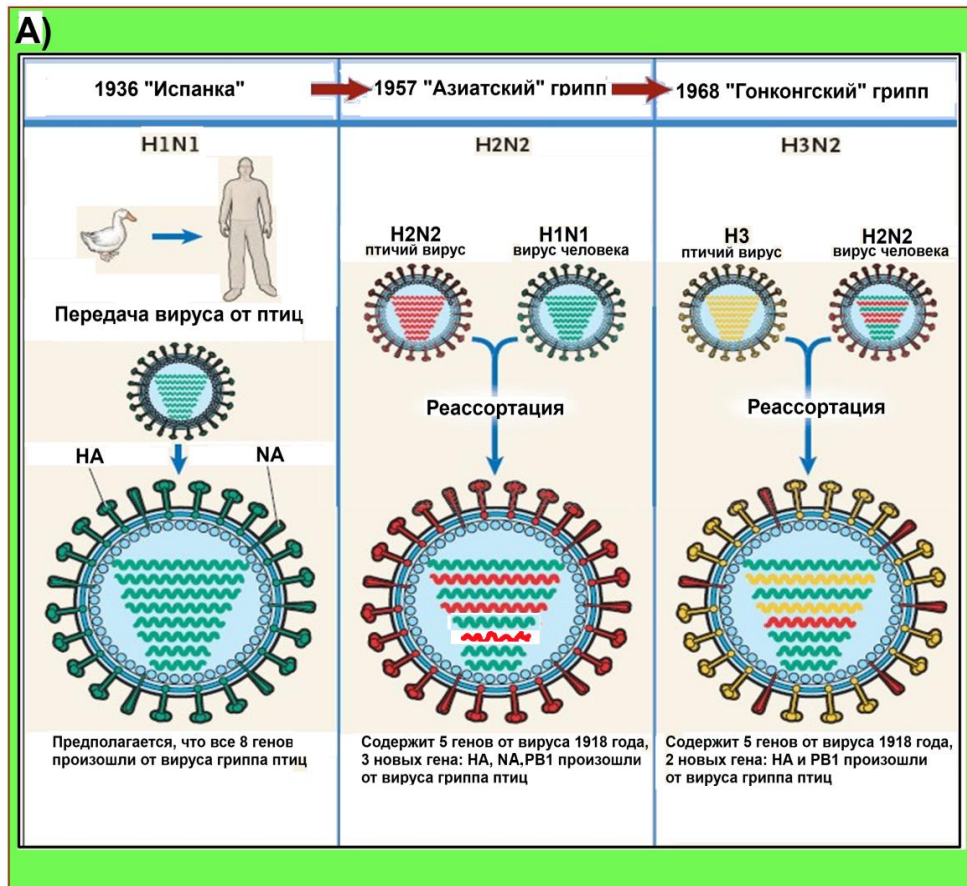
внедрения в геном вируса гриппа человека, циркулировавшего после «испанки» генов NA (H2), NA (N2) и PB1 птичьего происхождения [306, 487]. Погибло ~1,5 миллиона человек.

Пандемия «Гонконгского» гриппа А (H3N2)pdm1968. Возбудитель А/Гонконг/1/68 впервые был выделен в июле 1968 года и вызвал пандемию в зимние периоды 1968/1969 и 1969/1970 годов, вытеснив из циркуляции вирусы серотипа H2N2. Новый пандемический вирус также оказался реассортантом человеческого и птичьего гриппа. Штамм произошел в результате наследования вирусом предшествующей пандемической волны генов NA (H3) и PB1 от вируса птичьего происхождения [306, 487]. «Гонконгский» грипп убил ~1 млн. человек.

«Русский» грипп А (H1N1)1977. Вспышка заболеваемости, вновь вызванная вирусом гриппа А (H1N1), началась в Китае в мае 1977 года. Зимой 1977/1978 года эпидемия распространилась в Северном полушарии. Возбудитель А/Хабаровск/90/77, иначе названный «Русским» гриппом, поскольку впервые был выделен в СССР, обладал большим сходством с вирусами H1N1, циркулировавшими в 1952-м году. До сих пор не опровергнуты появившиеся сразу предположения, об инциденте, который привел к случайной утечке штамма из китайской лаборатории [413]. Вирус вызвал умеренную заболеваемость преимущественно среди молодых взрослых людей, родившихся позже 1956 года, не имевших иммунитета к возбудителю гриппа 1950-х годов, поэтому возбудитель нельзя считать полноценно пандемическим [545].

Пандемия А (H1N1)pdm2009. Первую пандемию 21 века вновь вызвал вирус серотипа H1N1, который возник в результате реассортации вирусов гриппа свиней двух линий – евразийской и американской [203, 238, 402]. Евразийский вирус перешел к свиньям от птиц в 1979 году. Американский вирус гриппа свиней представляет собой тройной реассортант, он является продуктом комбинации генов трех вирусов разных хозяев. Его предками являются свиной классический вирус гриппа (выделенный в 1930 году Р. Шоупом), североамериканский птичий и вирус H3N2 человека, которые вступили в реассортацию в 1998 году в Северной Америке. Дальнейшая реассортация американского и евразийского вирусов гриппа свиней привела к появлению нового возбудителя пандемии (рис. 2.4). Вирус

А (H1N1)pdm2009 включает гены NA и М от евразийского вируса, PB1 – от вируса человека, PB2 и PA – от вируса птиц, а гены NA, NP, NS – от классического свиного вируса [238]. Повторное появление пандемического гриппа серотипа H1N1 в 2009 году, антигенно и структурно тесно связанного с возбудителем пандемии 1918 года, но с значительно меньшей вирулентностью, оказалось неожиданным. Первые заболевания были зарегистрированы в Мексике в феврале-марте 2009 года. В середине апреля прототип пандемического вируса, штамм вируса гриппа А/Калифорния/07/2009, был выделен в Южной Калифорнии, США. За несколько месяцев вирус распространился повсеместно [405], вызвав миллионы случаев



Б)

PB2	птичий
PB1	человека
PA	птичий
HA	свиной классический
NP	свиной классический
NA	свиной Евразийский
M	свиной Евразийский
NS	свиной классический

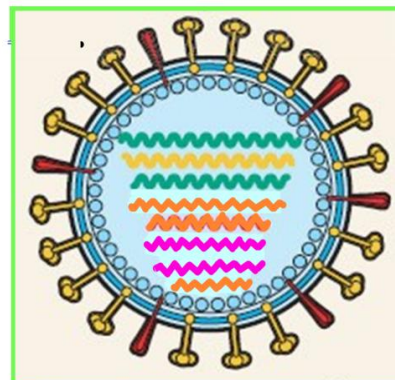


Рисунок 2.4 – Происхождение генов пандемических вирусов гриппа
 А) – H1N1(1918) pdm, H2N2(1957) pdm, H3N2(1968) pdm (цитируется по [146]);
 Б) – H1N1(2009) pdm.

заболеваний и по оценкам ВОЗ на 19 марта 2010 года привел к более чем 16813 лабораторно подтвержденных смертельных исходов [568]. По уточняющим данным, приведенным в работах [169, 204, 499], за первый год пандемии смертность была значительно выше и составила от 151700 до 579000 человек. Пандемия расценивается как умеренная. Объясняется это тем, что антигенно возбудитель был сходен с вирусами H1N1, циркулировавшими до 1957 года, и обычно наиболее уязвимый контингент – люди старше 65-летнего возраста перенесли относительно легкую инфекцию, сохранив перекрестный иммунитет [569]. Более тяжелая

заболеваемость в ряде случаев затронула молодых здоровых людей 25-45 лет, беременных женщин [567]. Респираторная инфекция осложнялась первичной вирусной (у взрослых) или вторичной бактериальной (у детей) бронхопневмонией и развитием острого дистресс синдрома. По сравнению с сезонными H1N1 вирусами, возбудитель H1N1pdm2009 также является более сильным индуктором противовоспалительных медиаторов. Вирус продолжает циркулировать по настоящее время, перейдя в разряд сезонных возбудителей гриппа.

По опыту пандемий 20-го века, появление нового пандемического вируса знаменуется загадочным исчезновением его предшественника, дрейфующего в сезонных эпидемиях. Р. Palese с соавторами [325, 437], на примере пандемии H1N1 2009, была высказана убедительная гипотеза, суть которой заключается в том, что механизмом, приводящим к элиминации предшествующего возбудителя, является усиление в популяции выработки антител к консервативному стеблю HA. Мембранная проксимальная область ножки HA, в отличие от варибельной головки, консервативна среди гемагглютининов 1-й группы, среди HA 2-й группы и среди HA вирусов гриппа В. У людей, перенесших заболевание сезонным гриппом, антитела вырабатываются преимущественно к иммунодоминантной области глобулярной головки HA, и лишь в небольшом количестве формируется В-клеточный иммунный ответ, специфичный к субиммунодоминантному домену стебля. После пандемии H1N1 2009 года, у возбудителя которой дивергенция с предшествовавшим возбудителем H1N1 в иммунодоминантной области головки HA составила 30%, произошло бустирование иммунного ответа к области консервативного у обоих вирусов стебля. Этого было достаточно для выдавливания из популяции сезонного вируса H1N1 предшественника новой пандемии. Вероятно, таков же сценарий замещения пандемическим штаммом H2N2 в 1957 году вирусов H1N1 предыдущего пандемического цикла. Оба возбудителя имеют HA 1-й группы с антигенно отличающимися головками, но консервативным доменом стебля. Исчезновение в 1968 году штаммов человека H2N2 после внедрения в популяцию вируса H3N2, HA которого относится ко 2-й группе, может быть обусловлено сходным механизмом с различием в том, что антитела, вероятно, бустировались к эпитопам более консервативной HA [316, 437].

Исключением стала совместная циркуляция вирусов H3N2 и H1N1 после 1977 года, когда вернувшиеся в сообщество вирусы H1N1, не смогли вытеснить вирусы H3N2. Оба сероподтипа социркулируют среди людей по настоящее время. Совместная циркуляция этих вирусов привела к распространению реассортантов H1N2 в 2001 году, однако реассортантные вирусы не получили эпидемического преимущества и в дальнейшем исчезли. Лишь в 2009 году вирусы сероподтипа H1N1, дрейфовавшие с 1977 года, были вытеснены новым, отдаленным от них вариантом того же сероподтипа H1N1pdm2009 [401].

2.2.2.2 *Эпидемии гриппа.* За пандемией гриппа следует период эволюции ее возбудителя.

С 1977 года сезонная заболеваемость связана с вирусами гриппа А серотипов H1N1, H3N2 и вирусами гриппа В. Антигенная изменчивость вирусов гриппа представляет серьезную угрозу здоровью: суммарная смертность за минувшие 100 лет от ежегодных эпидемий гриппа превысила даже показатели смертности трех вместе взятых пандемий [490, 554].

Наиболее тяжелую заболеваемость вызывают возбудители H3N2, хотя вирусы H1N1 и две антигенно разошедшиеся линии вируса гриппа В, В/Виктория/2/87 («Виктория») и В/Ямагата/16/88, («Ямагата»), также зачастую являются причиной тяжелых инфекций [246]. После пандемии 2009 года наиболее тяжелые заболевания связаны с вирусом H1N1pdm2009, перешедшим в разряд сезонных возбудителей. При этом сезонные вирусы H3N2 в 2011/12 году возобновили свою активность. Данные за последние 25 лет об эволюции сезонных вирусов гриппа, тяжести вызываемых ими эпидемий, соответствии применявшихся вакцинных препаратов возбудителям приведены в таблице 2.1.

Модель эволюции возбудителей гриппа в пространстве и во времени изучена на основе антигенного и генетического анализа гемагглютининов десятков тысяч вирусов, выделенных на протяжении ряда лет на шести континентах [143].

Установлено, что в регионах Восточной и Юго-Восточной (В. и Ю-В.) Азии наблюдается непрерывная циркуляция вирусов H3N2. Через локальные эпидемии в этих географических областях, которые часто перекрываются по времени, создается общая региональная эпидемическая сеть. Из Китая, Ю-В. Азии и Индии вирусы гриппа H3N2 ежегодно приобретают эпидемическое распространение в регионы с умеренным климатом. Обычно штаммы-основатели эпидемий сначала получают распространение в Океании, Северной Америке и Европе, позже – в Южной Америке. За пределами В., Ю-В. и Южной Азии циркуляция вирусов H3N2 уже не вносит такого существенного вклада в долгосрочную вирусную эволюцию [453, 482].

Эволюция генома вируса гриппа А характеризуется частыми реассортациями и периодическим селективным отбором, при этом серотипы H3N2 и H1N1 имеют различную эволюционную динамику [143].

Глобальные модели циркуляции вирусов H1N1 (возбудителей сезонного гриппа до 2009 года), а также вирусов В линий «Виктория» и «Ямагата», существенно отличаются от вирусов H3N2, о чем свидетельствует анализ 9604 последовательностей гемагглютинина сезонных вирусов гриппа человека 2000 – 2012 годов выделения.

Генетические варианты вирусов H3N2 в одном географическом регионе между эпидемиями не персистировали, а всегда распространялись из В. и Ю-В. Азии, тогда как генетические варианты вирусов А(H1N1) и В сохранялись в течение нескольких сезонов

локально, и в распространении новых вариантов этих вирусов В. и Ю-В. Азия играла ограниченную роль. Распределение вирусов H1N1 по географическим регионам было особенно заметно в 2004/2005 году, когда получили распространение три социркулирующие генетические линии. Каждая линия, независимо от другой, приобрела мутации в HA, которые привели к антигенной эволюции от фенотипа подобного A/Новая Каледония/20/1999, к фенотипу A/Соломоновы острова/3/2006. Эти линии циркулировали в Ю-В. Азии (1 линия), Китае (2 линия) и Индии (3 линия). В конечном итоге индийская линия распространилась по всему миру и циркулировала до появления вирусов H1N1pdm09.

Линии вирусов В ветвей «Виктория» и «Ямагата» часто по несколько лет циркулировали за пределами В. и Ю-В. Азии, при этом нет доказательств их проникновения с Востока и Ю-В. Азии. Показательным является пример возникновения Североамериканских (С-А.) вирусов «Викторианской» ветви сезона 2006/2007 года непосредственно из С-А. вирусов 2005/2006 года, а также происхождение С-А. вирусов В/«Ямагата» 2001/2002 года непосредственно из С-А. вирусов сезона 2000/2001 года. При этом линии вирусов, циркулирующих в пределах В. и Ю-В. Азии, характеризовались обособленным распространением исключительно в этом регионе на протяжении более чем 1 года. Долгий период независимой локальной циркуляции на Востоке и Ю-В. Азии был характерен для «Викторианских» вирусов. Там на протяжении более 5-ти лет, без распространения в другие регионы, циркулировали две ветви, что в итоге привело к совместной циркуляции трех отдельных антигенных вариантов «Викторианских» вирусов в различных частях мира в течение 2007- 2008.

Филогенетический анализ выявляет более высокую скорость нуклеотидных мутаций и аминокислотных замен у вирусов H3N2 и H1N1 по сравнению с вирусами гриппа В. Вирусы H3N2 характеризуются быстрой линейной поступательной эволюцией, антигенный дрейф вирусов H1N1 слабее, он выражается разнообразными ответвлениями от общего филогенетического ствола. Для вирусов гриппа В характерно большее генеалогическое разнообразие [143].

Наблюдается корреляция между скоростью антигенного дрейфа вирусов и скоростью их глобального перемещения. Хотя у вирусов H3N2 и H1N1 скорость генетической эволюции одинакова, но антигенно вирусы H1N1 и В эволюционировали медленнее в сравнении с вирусами H3N2. Соответственно, вирусы H3N2 чаще перемещаются между регионами, чем вирусы H1N1 и В. Более медленное глобальное перемещение вирусов гриппа H1N1 и В приводит к меньшей популяции восприимчивых лиц, снижению возраста инфицируемых, и более мелким, менее частым эпидемиям по сравнению с вирусами H3N2.

Следствием быстрого антигенного дрейфа является большая частота инфекций, взросление контингента болеющих лиц, но меньшие различия в линейной эволюции вирусов.

Таблица 2.1 - Характеристика эпидемических по гриппу сезонов и состав противогриппозных вакцин*

Эпид. сезон, (гг.)	Характеристика эпид. сезона		Доля участия вирусов гриппа А		Доля участия вирусов гриппа В		Состав вакцины
	% А	% В	H1N1 (% от всех А)	H3N2 (% от всех А)	Ямагата-подобные (% от всех В)	Виктория-подобные (% от всех В)	
2015/16	56% в Европе эпид. активность ниже прошлой	44% в Европе	А/Калифорния/07/09 преобладал (46% Европа)	А/Швейцария/9715293/13 (7-10% Европа)	В/Пхукет/3073/2013 (1-23% Европа)	В/Брисбен/60/08 преобладал (21-43% Европа)	А/Калифорния/07/09pdm А/Швейцария/9715293/13 В/Пхукет/3073/2013 В/Брисбен/60/08
2014/15	93% эпидемическая активность высокая, пожилые и дети	7%	А/Калифорния/07/09 (0,4%)	А/Техас/50/12 (30%) А/Швейцария/9715293/13 (70%) 99,6%	В/Массачусеттс/2/12 (69%)	В/Брисбен/60/08 (31%)	А/Калифорния/07/09pdm А/Техас/50/12 В/Массачусеттс/2/12 В/Брисбен/60/08
2013/14	95% эпидемическая активность очень низкая	5%	А/Калифорния/07/09 (59-95%) (преобладал в Америке и Западной Европе)	А/Техас/50/12 (5-41%) (преобладал в Восточной Европе)	В/Массачусеттс/2/12 (84%) (преобладал в конце эпид. сезона)	В/Брисбен/60/08 (6%) (в некоторых регионах более 30%)	А/Калифорния/07/09pdm А/Техас/50/12 В/Массачусеттс/2/12 В/Брисбен/60/08
2012/13	эпидемическая активность высокая, сравнима с сезоном 2010/11		А/Калифорния/07/09 (3%)	А/Виктория/361/11 (97%)	В/Висконсин/1/10 (71%, в конце эпид. сезона)	В/Брисбен/60/08 (29%, в конце эпид. сезона)	А/Калифорния/07/09pdm А/Виктория/361/11 В/Висконсин/1/10
2011/12	(33-86%) эпидемическая активность низкая	(14-67%)	А/Калифорния/07/09 (26-49%)	А/Перт/16/2009 (51-74%) В США преобладали	В/Висконсин/1/10 (49%)	В/Брисбен/60/08 (51%) (89% в России)	А/Калифорния/07/09pdm А/Перт/16/2009 В/Брисбен/60/08
2010/11	(72%) эпидемическая активность высокая, ниже 2009/10	(28%)	А/Калифорния/07/09pdm (15% США; до 99,4% Европа)	А/Перт/16/2009 (0,6% Европа; 85% США)	В/Флорида/04/06 (7%)	В/Брисбен/60/08 (93%)	А/Калифорния/07/2009pdm А/Перт/16/2009 В/Брисбен/60/08
2009/10	(98%) ПАНДЕМИЯ	(2%)	А/Калифорния/07/09pdm (99,7%)	А/Перт/16/2009 (0,3%)	В/Флорида/04/06 (11,6%)	В/Брисбен/60/08 (88,4%)	А/Брисбен/59/07 А/Брисбен/10/07 В/Брисбен/60/08
2008/09	72% эпидемическая активность низкая	28%	А/Брисбен/59/07 (87%)	А/Брисбен/10/07 (13%)	В/Флорида/04/06 (19%)	В/Брисбен/60/08 (81%)	А/Брисбен/59/07 А/Брисбен/10/07 В/Флорида/04/06

Таблица 2.1 - (продолжение)

2007/08	84% эпид. активность умеренная, дети	16%	А/Соломоновы острова/03/06 (45%)	А/Висконсин/67/05 (14%) А/Брисбен/10/07 (81%)	В/Флорида/04/06 (94%)	В/Малайзия/2506/04 (6%)	А/Соломоновы о-ва/03/06 А/Висконсин/67/05 В/Малайзия/2506/04
2006/07	66% эпид. активность умеренная	34%	А/Новая Каледония/20/99 (96%)	А/Висконсин/67/05 (4%)	В/Флорида/04/06 (33%)	В/Малайзия/2506/04 (В/Огайо/01/05) (67%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Висконсин/67/05 В/Малайзия/2506/04 (В/Огайо/01/05)
2005/06	80,9% эпид. активность низкая, болели дети	19,1%	А/Новая Каледония/20/99 (7,6%, в Азии преобладал)	А/Калифорния/07/04 (92,4%)	В/Шанхай/361/02 (В/Флорида/07/04) (21,9%)	В/Малайзия/2506/04 (78,1%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Калифорния/07/04 И/Джилин/20/03
2004/05	79,1% эпид. активность умеренная	20,9%	А/Новая Каледония/20/99 (0,3%)	А/Вайоминг/0/03 (36%) А/Калифорния/07/04 (64%) (всего НЗ-99,7%)	В/Шанхай/361/02 (65,5%)	В/Гонконг/330/01 (23,5%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Вайоминг/0/03 В/Джилин/20/03 (В/Шанхай/361/02)
2003/04	99,2% эпид. активность умеренная	0,8%	А/Новая Каледония/20/99 (0,1%)	А/Панама/2007/99 (99,9%)	В/Сичуань/379/99 (89%)	В/Гонконг/330/01 (11%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Москва/10/99 В/Гонконг/330/01
2002/03	45,3% эпид. активность умеренная	54,7%	А/Новая Каледония/20/99 (69,2%); реассортанты Н1N2-30,8% (всего Н1-81,9%)	А/Панама/2007/99 (18,1%)	В/Сичуань/379/99 (0,7%)	В/Гонконг/330/01 (99,3%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Москва/10/99 В/Гонконг/330/01
2001/02	эпид. активность низкая, ниже прошлогодней		Н1N1 и Н1N2	А/Москва/10/99, преобладали	В/Сичуань/379/99 и дрейфовые варианты (45%)	В/Гонконг/330/01 (55%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Москва/10/99 В/Сичуань/379/99
2000/01	эпид. активность умеренная		А/Новая Каледония/20/99, эпидемическое значение	А/Москва/10/99, спорадически	В/Сичуань/379/99, везде (69%)	В/Гонконг/22/01, циркулировал локально в Ю-В Азии (31%)	А/Новая Каледония/20/99 А/Москва/10/99, (А/Панама/2007/99(НЗN2) В/Пекин/184/93 (в вакцине- В/Харбин/7/94)
1999/00	99,8% смертность 11%; эпид. активность высокая	0,2%	А/Берн/7/95, А/Пекин/262/95, А/Новая Каледония/20/99 (1%)	А/Сидней/5/97 (99%)	В/Яманаши/166/98 (0,2%)	В/Шангдонг/7/97 цирку лировал локально в Ю- В Азии	А/Пекин/262/95 А/Сидней/5/97 В/Пекин/184/93
1998/99	73% эпид. активность выше умеренной	27%	А/Берн/7/95 (76%), А/Пекин/262/95 (24%) (спорадически, 2%)	А/Сидней/5/97 (98%)	В/Яманаши/166/98 (27%)	В/Шангдонг/7/97 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Пекин/262/95 А/Сидней/5/97 В/Пекин/184/93

Таблица 2.1 - (продолжение)

1997/98	эпид. активность от умеренной до высокой		А/Берн/7/95, А/Пекин/262/95 спорадически	А/Сидней/5/97(81%) А/Ухань/359/95 (19%) доминировали	В/Пекин/184/93 В/Харбин/7/94 спорадически	В/Шангдонг/7/97 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Берн/7/95 А/Вуйян/359/95 (в вакцине-А/Иоганнесбург/82/96) В/Пекин/184/93
1996/97	93,4%	6,6%	А/Берн/7/95 спорадически	А/Ухань/359/95 преобладали	В/Пекин/184/93 (32%)	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии (68%)	А/Техас/36/91 А/Вуйян/359/95(в вакцине-А/Нанчанг/993/95) В/Пекин/184/93
1995/96	эпид. активность от умеренной до высокой		А/Техас/36/91, А/Берн/7/95 Эпидемии вызваны социркулирующими вирусами А(Н1N1)и (Н3N2), доля участия разных регионах отличалась	А/Иоганнесбург/33/94 и А/Ухань/359/95	В/Пекин/184/93 и В/Харбин/7/94 (в конце эпид. сезона)	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Техас/36/91 А/Иоганнесбург/33/94 В/Пекин/184/93(в вакцине-В/Харбин/07/94)
1994/95	78%	22%	А/Техас/36/91, спорадически (1%)	А/Шангдонг/09/93 и А/Иоганнесбург/33/94 (99%)	В/Пекин/184/93	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Техас/36/91 А/Шангдонг/09/93 В/Панама/45/90
1993/94	80%	20%	А/Техас/36/91, спорадически	А/Пекин/32/92и А/Шангдонг/09/93 преобладали	В/Панама/45/90	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Техас/36/91 А/Пекин/32/92 В/Панама/45/90
1992/93	эпид. активность умеренная		А/Техас/36/91 спорадически	А/Пекин/383/89 преобладали	В/Панама/45/90 спорадически	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Техас/36/91 А/Пекин/383/89 В/Панама/45/90
1991/92	99,9%	0,1%	А/Техас/36/91 (А/Тайвань/1/86, до 20% изолятов Н1)	А/Пекин/383/89 преобладали	В/Панама/45/90 спорадически	В/Виктория/2/87 циркулировал локально в Ю-В Азии	А/Тайвань/1/86 А/Пекин/383/89 В/Панама/45/90
1990/91	преобладали вирусы В. Эпид. активность низкая		А/Тайвань/1/86 спорадически и локально	А/Пекин/383/89 основная активность в Южном полушарии	В/Панама/45/90 локальные вспышки среди детей	В/Виктория/2/87 - только в Великобритании	А/Тайвань/1/86 (Н1N1) А/Шанхай/16/89 (Н3N2) В/Ямагата/16/88

*По материалам: [83, 162, 171, 215, 577, 578] .

Обратная зависимость между скоростью эволюции и генеалогическим разнообразием вирусов связана с тем, что растущая частота мутаций коррелирует с антигенным дрейфом, это способствует росту адаптивной эволюции, приводящей к снижению генетического разнообразия НА [143].

Быстрому глобальному распространению вирусов гриппа в современном мире способствуют технократические средства мобильности [353].

Эпидемическая активность современных вирусов гриппа В значительно возросла. Они активно эволюционируют и являются участниками почти ежегодных эпидемий. Особенностью эволюции вирусов гриппа В является систематическое появление в геноме делеций и вставок [417]. Начиная с конца 1970-х годов, наблюдается попеременная циркуляция двух антигенно различающихся линий – В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных вирусов [266].

С 1990 по 2001 годы в Европе, Америке, Африке и Австралии циркулировали только штаммы линии «Ямагата». Последний раз штамм этой линии В/Сычуань/379/99 был рекомендован ВОЗ для эпидемического сезона 2001-2002 гг. (в производстве вакцин использовались В/Иоганнесбург/5/99 или В/Виктория/504/01). «Викторианские» штаммы широкого распространения не имели и циркулировали ограниченно в странах Ю-В Азии.

С 2001 года и по начало 2003 года из Азии распространились по всему миру штаммы линии «Виктория». Большинство штаммов представляли собой антигенные реассортанты, которые имели НА от «Виктория»-подобных вирусов, а NA от В/Сычуань-подобных вирусов ветви «Ямагата» [396].

В 2003-2004гг. опять в циркуляцию вернулись вирусы линии «Ямагата», которые антигенно отошли от последнего вакцинного штамма из этой группы - В/Сычуань/379/99. 2010-2011 годы характеризовались одновременной циркуляцией вирусов обеих антигенных ветвей. Понимание пространственно-временных закономерностей возникновения, глобальной миграции и циркуляции новых сезонных вариантов вирусов гриппа человека имеет существенное значение для предупреждения их распространения, надзора за циркулирующими вирусами, грамотной оценки эпидемиологической ситуации, сведения к минимуму несоответствия между используемыми для профилактики вакцинами и реальными возбудителями эпидемий.

2.3 ВИРУСЫ ГРИППА, ОБЛАДАЮЩИЕ ПАНДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Риск пандемии высок, если новый вирус способен вызывать заболевание человека, обладает антигенными свойствами, к которому популяция иммунологически наивна, при этом может устойчиво распространяться между людьми [158].

Теоретически пандемическую угрозу могут нести все сероподтипы вирусов гриппа, циркулирующие среди животных, в частности птиц и свиней, как обладающие незнакомыми человеку антигенами. Вероятно также, что новую пандемию способны спровоцировать циркулировавшие прежде у человека вирусы сероподтипов H1N1, H2N2 и H3N2, если у значительной прослойки людей утрачен иммунитет. Среди возбудителей прежних пандемий в современном сообществе угрозу могут представлять вирусы сероподтипа HA H2, которые в последний раз вызывали эпидемическую заболеваемость почти 50 лет назад. Свиные/птичьи вирусы сероподтипа H2 (H2N3) продолжают циркулировать в свиньях, имеют α -2,6 рецепторную специфичность [368], поэтому их внедрение в человеческую популяцию представляется вполне вероятным.

Большинство вирусов гриппа зоонозного происхождения, спорадически заражающих человека при тесном контакте с животными, не имеют возможности эффективно распространяться аэрозольным путем между людьми [168], однако адаптация зоонозных вирусов к человеку за счет мутаций или реассортации с вирусами гриппа человека может привести к возникновению передающихся респираторным путем штаммов. Возможные возбудители пандемий будущего, расположенные по уровню предполагаемой опасности, перечислены в таблице 3.3. Среди зоонозных возбудителей наибольшую угрозу могут представлять вирусы птиц сероподтипов H5, H7, H9.

Вирусы гриппа птиц. HPAIV H5N1 впервые вызвал смертельные заболевания человека в 1997 году в Гонконге; из 18 зараженных 6 человек погибли [190, 511]. Генетическая характеристика изолированных в 1997 году от людей и домашних птиц вирусов H5N1 дает основания полагать, что они являются реассортантами, которые приобрели гены внутренних белков от вирусов птиц H9N2 или H6N1, а N1 NA от вируса птиц H6N1 [253]. Для предотвращения распространения инфекции было уничтожено огромное поголовье домашних птиц, и вспышка была взята под контроль. После периода локальных спорадических случаев инфекции новая вспышка началась в 2003 году. С этого времени HPAIV H5N1 быстро эволюционируют. С 2008 года зафиксирована циркуляция HPAIV H5N1, по антигенным характеристикам HA отнесенным к 10 клейдам (0 – 9) и многочисленным субклейдам [294]. Они часто вступали в реассортацию [253, 502], распространились по Европе и Африке и стали инфицировать популяцию домашних птиц в странах Ю-В. Азии [212].

HPAI вирусы H5N1 обладают несколькими настораживающими отличительными особенностями [420]:

(1) вызывают летальность не только у домашних птиц, но и у диких водоплавающих птиц, которые являются природным резервуаром вирусов гриппа А;

- (2) без предварительной адаптации способны к репликации у мышей с развитием летальной инфекции;
- (3) инфицируют с фатальным исходом ряд видов млекопитающих, а также отмечены факты нелетальных инфекций свиней;
- (4) с годами усилилась их патогенность для хорьков, что указывает на приобретение вирулентных для млекопитающих мутаций;
- (5) наибольшее беспокойство вызывают случаи трансмиссивности НРАIV людям, приводящие к тяжелым инфекциям нижних дыхательных путей с развитием пневмонии, и высокому уровню смертности.

По данным ВОЗ, за период с 2003 по 26.09.2016 года, зарегистрировано 870 случаев инфицирования людей НРАI вирусами H5N1 в 16 странах; 458 человек (53%) погибли от вирусной пневмонии [574]. Описано несколько случаев внутрисемейного распространения инфекции, но устойчивой передачи вируса от человека к человеку не отмечалось [170]. Таким образом, вирусы H5N1 характеризуются высокой смертностью, но, по крайней мере пока, не отличаются эффективностью распространения среди людей.

С 2014 года заболеваемость и смертность людей вызывают также вирусы сероподтипа H5N6, которые являются реассортантами вирусов птиц H5N1 и H6N6 [147, 575]. А с 2010 года в Азии среди диких птиц циркулирует также НРАIV H5N8, в 2014/2015 годах этот вирус распространился по Европе и Северной Америке. Случаев заражения человека не отмечено, и меток патогенности вируса для человека не обнаружено [216].

Вирус H7N9, апатогенный для птиц, оказался высоковирулентным для людей. По данным на 26.09.2016, с февраля 2013 года вирус вызвал инфекции нижних дыхательных путей у 798 человек в Китае, 320 случаев заболеваний (40%) привели к фатальному исходу [575]. Все случаи инфицирования являются результатом непосредственного контакта человека с домашними птицами. Эволюционный анализ показал, что выделенный от человека вирус H7N9, представляет собой реассортант, который произошел от птичьих вирусов H9N2, H7N3 и H11N9. Внутренние гены вируса H7N9 принадлежат к той же генетической линии, что и у вируса H5N1, поскольку у обоих вирусов они имеют родственное происхождение [541]. Вирус несет потенциальную угрозу для людей еще и потому, что из-за низкой патогенности не отслеживается у птиц, но при этом может быть передан людям [235].

Настораживает, что в аминокислотной последовательности белков птичьего вируса H7N9 присутствуют знаки, которые свидетельствуют о возможности трансмиссивности вируса между людьми: в позиции белка PB2-627 находится Lys, что присуще человеческим вирусам. В белке PA также имеются метки, свойственные вирусам человека: PA-100Ala, PA-356Arg и PA-409Asn [177]. Показано также, что некоторые изоляты H7N9 от человека обладали способностью к

воздушно-капельной передаче между хорьками [614]. С 2013 года вирус поражает также домашних птиц, распространяясь контактным путем и через инфицированную внешнюю среду. И это тоже тревожно, так как домашние птицы могут стать «мостиком» для адаптации вируса к человеку. Нарастание симптоматических проявлений в течение двух волн заболеваемости 2013 года привело к предположению о возможности ограниченной трансмиссивности вируса между людьми [329]. Тем не менее, устойчивой передачи вируса от человека к человеку до сих пор не наблюдается, и случаев заражения людей вирусами H7N9 за пределами Китая пока не зафиксировано.

К настоящему времени вирусы сероподтипа HA H7, как и H5, характеризуются высокой летальностью для людей, но не отличаются эффективностью распространения.

Вирусы сероподтипа H9N2, циркулирующие среди сельскохозяйственных птиц, с 1998 года вызывают случаи заболеваний у людей в Китае, один случай зафиксирован в Египте [576]. Сами по себе вирусы H9N2 приводят к относительно мягким инфекциям людей, контактирующих с домашними птицами, однако они являются донорами генов для инфицирующих человека вирусов сероподтипов H5N1, H7N9 и H10N8. Особая роль вирусов H9N2 во взаимодействии между животными и человеком может быть обусловлена широким кругом хозяев, включающим как птиц, так и млекопитающих, и обширным участием в реассортации [514].

К заболеваниям людей причастны также LPAI вирусы гриппа птиц сероподтипов H7N7, H7N3, H10N8, H6N1; в ряде случаев инфекции приводили к смертельным исходам [175, 223, 314, 365, 452, 525, 542, 607, 613].

Вирусы гриппа свиней периодически достаточно эффективно распространяются среди людей, но при этом вызывают ограниченное число фатальных инфекций [309, 552]. Антигенные свойства вирусов гриппа H3 людей и свиней свидетельствуют, что популяционный иммунитет не способен предотвратить интродукцию вирусов гриппа от людей к свиньям и наоборот [355].

В 2011 реассортантный вирус гриппа свиней H3N2v, в составе которого обнаружены также гены птиц, человека и М-ген от пандемического вируса А (H1N1)pdm2009, вызвал заболевания людей в США. В 2012 году, в разгар вспышки, зарегистрировано 309 случаев заболеваний, один человек погиб. Наличие гена М от возбудителя пандемии и большая уязвимость пострадавших (все они принадлежали к группам риска), вероятно, облегчили возможность инфицирования человека [166]. В настоящее время у людей регистрируются заболевания с мягкими симптомами, вызванные вирусами гриппа свиней H1N1v, H1N2v, H3N2v главным образом в США, Бразилии, Вьетнаме [576].

Приведенные факты свидетельствуют о том, что зоонозные вирусы гриппа различных сероподтипов, как антигенно не знакомые иммунной системе человека патогены, представляют

огромную потенциальную угрозу здоровью людей. Однако для реализации этой угрозы, помимо антигенной новизны они должны приобрести способность инфицировать клетки респираторного тракта и устойчиво распространяться от человека к человеку.

2.4 ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ТРАНСМИССИВНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА С ПАНДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Представление о детерминантах патогенности и понимание механизмов воздушно-капельного пути передачи дает возможность реально оценить угрозы зоонозных вирусов гриппа здоровью человека. К настоящему времени знания об этих многочисленных и взаимозависимых детерминантах находятся на стадии накопления фактов, и молекулярные механизмы их функционирования еще предстоит установить. Детерминанты специфичности к хозяину, патогенности и трансмиссивности имеют полигенную природу, варьируют у штаммов вируса гриппа, зависят от организма хозяина, имеют отличающиеся фенотипические проявления в различных методах исследования [152, 524]. Тропизм к кругу хозяев и вирулентность являются результатом оптимизированного молекулярного взаимодействия между вирусными белками и клеточными факторами. Вирусы гриппа используют различные стратегии, направленные на противодействие антивирусным программам хозяина. Проявление патогенности и трансмиссивности вирусов является следствием мутаций и/или реассортации при адаптации к новому хозяину.

Гемагглютинин и нейраминидаза как детерминанты патогенности. Первостепенный вклад в проявление тканевого тропизма, вирулентности и межвидовой передачи вирусов гриппа принадлежит белку НА и функционально связанному с ним белку НА.

Жизненный цикл вируса гриппа инициируется прикреплением вирусного НА к рецепторам клетки. Спектр сиалилоконъюгатов, к которым проявляют сродство вирусы, существенно варьирует у разных видов хозяев, также как типы тканей и клеток, на которые нацеливается вирус, что приводит к вариациям в рецепторсвязывающей специфичности вирусов, циркулирующих в этих хозяевах. Различия в специфичности к рецепторам являются основным барьером для межвидовой передачи [500]. Адаптация вирусов гриппа птиц к инфицированию людей происходит путем всего нескольких конкретных аминокислотных замещений в рецепторсвязывающем домене белка НА, перенастраивающегося на прикрепление к Sia α -2,6Gal рецепторам, которые преобладают в клетках верхнего респираторного тракта человека.

У Н2 и Н3 НА молекулярные детерминанты различной рецепторной специфичности преимущественно определяются аминокислотными остатками в положении 226 и 228 (следуя

нумерации для Н3 НА): Leu-226 и Ser-228 у человеческих НА и Gln -226 и Gly -228 у птичьих НА [384, 539].

Человеческие и птичьи вирусы сероподтипа Н1 в этом отношении отличаются: хотя они тоже распознают соответственно рецепторы, имеющие с сиалозидами α -2,6- или α -2,3-связь, но человеческие вирусы, как и птичьи, содержат Gln-226 и Gly-228. У них распознавание рецепторов обусловлено аминокислотными замещениями в других сайтах. Так, мутации в остатках 190 и 225 в Н1 НА человеческого вируса 1918 года полностью изменили его рецепторную специфичность [244, 535]. Причем единственная замена у пандемического вируса Glu190Asp приводила к двойственной α -2,3-/ α -2,6-рецепторной специфичности, если добавлялась замена Gly225Asp, то доминировало сродство к α -2,6-связанным рецепторам [244, 456]. У вирусов Н1N1, содержащих аспарагиновую кислоту в позициях 190 и 225, наблюдается способность к аэрозольной трансмиссии, при соответственном положении в этих позициях Glu и Gly, что определяет птичью респираторную специфичность, вирус к аэрозольной трансмиссии не способен [обзор 152]. К двойственной рецепторной специфичности вируса Н1N1pdm2009 приводило также аминокислотное замещение Asp222Gly (позиция 225 по Н3-исчислению). Вирусы с такой заменой отличались тяжестью вызываемого ими заболевания [189].

У двух изолятов Н5N1, которые вызвали ограниченную внутрисемейную инфекцию в 2003 году, единственная аминокислотная замена в рецепторсвязывающем сайте Ser227Asn привела к резкому снижению сродства к α -2,3-связанным рецепторам и появилась способность к связыванию α -2,6-специфичных рецепторов [231]. Стратегия приспособления к рецепторам человека у вирусов Н5N1 отличалась от известной стратегии вирусов сероподтипа Н1 и Н3. Замена Gln226Leu приводила к некоторому снижению сродства к α -2,3 рецептору. Основная же роль в способности взаимодействовать с α -2,6-терминированным рецепторами связана с заменами Ser227Asn и, особенно, Gly228Ser. Сочетание описанных замен 226 и 228 приводит к смешанному рецепторному фенотипу с хорошим сродством к α -2,6-специфичным рецепторам. Клоны вирусов Н5N1, содержащие аминокислотные замены Ser227Asn и Gln196Arg, либо Gly143Arg и Asn197Lys распознавали α -2,6-терминированные рецепторы. Выделенный от человека вирус Н5N1 с заменами Ala134Val и Ile151Phe характеризовался пониженным сродством к птичьим α -2,3 рецепторам [обзор 12].

Однако, несмотря на изменения рецепторной специфичности вирусов Н5N1, отсутствие трансмиссивности между людьми остается барьером для их пандемического распространения.

Существуют, как минимум, два требования для устойчивой передачи вируса от человека к человеку: эффективная репликация в организме хозяина-человека, это признак полигенный, и репликация в верхних отделах респираторного тракта для обеспечения передачи вируса через

дыхательные пути. Вирусы гриппа передаются от человека к человеку воздушно-капельным путем, главным образом посредством вдыхания мелкодисперсных аэрозолей (при чихании), за счет вдыхания крупных аэрозолей (при кашле), что случается при тесном и длительном контакте, либо и самоинфицированием через загрязненные руки [139].

В клетках трахеи человека преобладают гликопротеины, содержащие сиаловые кислоты с α -2,6-связью. Сиаловые кислоты с α -2,3-связью также присутствуют в клетках респираторного эпителия человека, хотя в значительно меньшем количестве [495]; поэтому люди и другие приматы могут быть заражены вирусами птичьего гриппа, хотя менее эффективно, чем человеческими штаммами. Дифференцированная экспрессия сиаловых кислот в дыхательных путях млекопитающих может помочь объяснить низкую инфекционность, но высокую вирулентность отдельных штаммов птичьего гриппа. У людей, в целом менее представленные гликопротеины с Sia α -2,3Gal-связью, наиболее распространены в нижних дыхательных путях (бронхиолы и альвеолы). Легкие не так доступны для передающихся воздушно-капельным путем вирусных частиц по сравнению с верхними дыхательными путями (носоглотка, придаточные пазухи, трахея и бронхи) [252]; так что инфекции вирусами птичьего гриппа относительно редки в людях. Однако когда штаммы птичьего гриппа все же инфицируют легкие человека, это приводит к развитию острой и быстро прогрессирующей пневмонии с уровнем смертности в 60% [233].

Патогенность НРАІ вирусов сероподтипов Н5 и Н7 определяется также наличием полиосновной последовательности в области кливедж-сайта предшественника гликопротеина НА0, что делает НА восприимчивым к активации вездесущими протеазами клетки [610]. У низковирулентных вирусов в сайте расщепления обычно присутствует единственный аминокислотный остаток аргинин, который хорошо экранирован цепями углеводов, и поэтому менее доступен протеазам. В то же время у высоковирулентного вируса «испанки» H1N1pdm1918 полиосновный сайт расщепления НА отсутствует [457]. У него реализуется другой механизм, в котором более эффективной активации НА содействует вирусная нейраминидаза. НА H1N1pdm1918 и некоторых других ранних вирусов гриппа способна связывать протеазы хозяина фрагментом в N-конце структуры. Связанный с вирусом фермент плазминоген попадает в эндосому, там он преобразуется в плазмин и уже в процессе проникновения в клетку расщепляет НА [534].

Замечено также, что патогенность вирусов гриппа птиц для млекопитающих может реализоваться через укорочение стебля нейраминидазы [389].

Несмотря на рост инфекций человека НРАІV H5N1, эти вирусы остаются неспособными к эффективной трансмиссии между людьми. Существенное значение в адаптации к хозяину, трансмиссивности и патогенности имеет стабильность НА вируса в кислой среде и

устойчивость к различиям в рН для осуществления конформационных преобразований НА. В процессе жизненного цикла вируса НА подвергается динамичным конформационным изменениям, которые зависят от рН в эндосоме. Кислая среда внутри эндосомы запускает структурное преобразование НА, которое индуцирует слияние оболочки вируса и эндосомальной мембраны и приводит к высвобождению вирусного генома [500]. У HPAIV H5N1 конформационные преобразования НА осуществляются при более высоких значениях рН, чем у вирусов гриппа человека, и их НА неустойчив при низких значениях рН. В результате вирусы птиц быстро разрушаются в кислой среде ВДП, что останавливает их трансмиссию [12].

Стабильность к рН среды у гемагглютининов природных изолятов может варьировать. Слишком высокие значения рН среды могут привести к инаktivации вириона еще до его эндоцитоза в клетку, слишком низкие значения рН слияния могут привести к деградации вируса еще до слияния. Вирус способен пересекать межвидовой барьер, если его НА приспосабливается к осуществлению структурных изменений в новых условиях среды. Это может происходить за счет приобретения специфических мутаций [209, 286].

В белке НА H5, способного распознавать рецепторы с α -2,6-связью и передаваться респираторным путем между хорьками за счет введения им специфических для вирусов человека рецепторсвязывающих мутаций, выявлены также мутации, приводящие к повышению термостабильности и влияющие на рН, при котором происходят обязательные для инфекционности вируса конформационные изменения. У трансмиссивного вируса появились две дополнительные мутации: элиминирующая потенциальный сайт гликозилирования (Asn158Asp) и повышающая стабильность НА (Thr318Ile) [262]. Возможность привязки к человеческому типу рецепторов, вместе с физической стабильностью и измененным порогом рН для конформационных изменений НА, может способствовать передаче вируса птичьего гриппа респираторным путем к млекопитающим.

Для эффективной и устойчивой трансмиссивности между людьми важную роль играет также баланс НА и NA, это было продемонстрировано на примере вируса H1N1pdm2009, нейраминидаза которого отличается очень высокой ферментативной активностью [601].

Полимеразный комплекс как детерминанта патогенности и трансмиссивности. Адаптация вируса птичьего гриппа к млекопитающим является следствием приспособления к новым условиям функционирования, что приводит к усилению активности вирусной полимеразы. Это обеспечивается взаимодействием полимеразы с клеточными механизмами ядерного импорта. РНК-зависимая-РНК-полимераза вирусов гриппа птиц, содержащая в 627 позиции белка PB2 Glu, плохо работает в клетках млекопитающих, поскольку в там присутствуют мощные факторы, выборочно ограничивающие функции чужеродных полимераз [393]. Замена Glu-627-Lys, как детерминанта круга хозяев для млекопитающих, описана *in vitro*

[509], *in vivo* – в экспериментах на мышах [377] и морских свинках. У морских свинок отмечено усиление репликации вируса птиц при пониженной температуре респираторного тракта (33°C), вероятно, этим обусловлена устойчивая трансмиссия к млекопитающим [366]. Это предположение подтверждается исследованиями на хорьках, установивших, что замещение Lys-627-Glu прекращало аэрозольную трансмиссивность вируса «испанки» [536]. Вирусы H1N1pdm2009 имеют Glu в 627 позиции, возможно этим объясняется сниженная эффективность аэрозольной трансмиссивности этого вируса на хорьках по сравнению с сезонными вирусами H1N1 [377]. Реконструирование функционального рибонуклеопротеина *in vivo* показало, что полимеразные комплексы вирусов гриппа А птиц, обнаруживали чувствительность к холоду при 33-37°C в клетках млекопитающих, которая главным образом определялась аминокислотным остатком PB2 627. Снижение способности полимеразного комплекса птичьих вирусов к репликации при 33°C может быть препятствием к эффективному росту в организме человека [381].

Мутация PB2 627-Lys не всегда была обязательной при инфицировании людей высокопатогенными вирусами гриппа птиц H5 и H7. В такой ситуации все HPAIV H5 и H7 имели другие замены в белках полимеразного комплекса, вовлеченные в адаптацию к репликации у человека [178, 206].

Геномы вирусов гриппа А птиц и человека имеют отличия в 52 ассоциированных с видом хозяина позициях, из них 35 отличий – в полимеразном комплексе [176]. Включение единственного гена PB2 смертельного для мышей вируса А/Гонконг/483/97 (H5N1) в состав реассортанта с остальными генами от апатогенного для мышей вируса А/Гонконг/486/97 (H5N1), приводило проявлению летального фенотипа [263]. Совместное участие мутантных белков NP (Asn-319-Lys) и PB2 (Asp-701-Asn) влияло на кинетику ядерного импорта, содействуя репликации вирусов H5N1 у мышей [227, 359].

О патогенной роли вовлеченного в апоптоз иммунных клеток белка PB1-F2 и других недавно открытых неструктурных белков полимеразного комплекса упоминалось в разделе 1.2.

NS1 белок как детерминанта патогенности. Ускользание от иммунного ответа хозяина является несомненной детерминантой патогенности. Врожденная система иммунитета является первой линией обороны организма. В этой системе ключевая роль принадлежит интерферону I типа. Белок вируса NS1 выполняет функцию антагониста интерферона, он играет многофункциональную роль в предотвращении активации факторов транскрипции интерферона [258]. Роль белка NS1 как антагониста интерферона была показана, в частности, на имбредных мышах, у которых отсутствует функциональный ген Mx1. Этот ген является важным фактором приведения клеток в противовирусную активность, отсутствие гена не дает возможности защитным факторам клеток противостоять вирусу [239]. Фактором патогенности белка NS1

вирусов «испанки» H1N1 и HPAIV H5N1 является вставка из четырех аминокислот в С-концевой его последовательности [239, 258, 292].

Высокопатогенные вирусы H1N1pdm1918 и H5N1 объединяет способность вызывать аномальные врожденные иммунные реакции у мышей и нечеловеческих приматов [303, 324]. Это свойство, вероятно, послужило причиной патогенности вируса «испанки» и высокой смертности людей [206]. Исследования воссозданного методами обратной генетики вируса «испанки» обнаружили, что белок HA [533], репликативный комплекс [549], белки NS1 [239] и PB1-F2 [394] вносят свой вклад в вирулентность, а белки HA и PB2 определяют трансмиссивность [536].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что метки патогенности для млекопитающих/людей обнаруживаются в следующих белках и аминокислотных позициях высокопатогенных зоонозных и пандемических вирусов гриппа:

У вируса H1 «испанки»:

PB2 Glu 627 Lys [524];
HA [324];
NA [534];
NS1 [239].

У вирусов H5 HPAI:

PB2 Glu 627 Lys [263];
PB2 Asp 701 Asn [359];
HA [495, 537];
NS1 [491].

У вирусов H7 LPAI и HPAI:

PB2 Glu 627 Lys [404, 495];
PB2 Asp 701 Asn [178];
PB2 Gln 591 Lys [178];
PB2 Met 535 Leu [178];
HA [404].

2.5 ФАКТОРЫ ЭВОЛЮЦИИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВИРУЛЕННОСТЬ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА

В ходе естественной эволюции вирусы гриппа подвержены изменчивости по многим признакам. Вероятно, генетическая и фенотипическая изменчивость имеет значение в противостоянии вирусов селективному прессу организма хозяина. Так, некоторые из циркулирующих вирусов могут приобрести устойчивость к противовирусным препаратам, могут отличаться по вирулентности, по антигенным и биологическим свойствам. Это может приводить к возникновению вирионов, вызывающих новые проявления заболеваний. Способность противостоять нейтрализующему действию не только специфических факторов иммунитета, но и неспецифических подавляющих вирус воздействий – одна из движущих сил эволюции эпидемических вирусов гриппа. Механизмы неспецифической защиты полигенны по своей природе и включают [126]:

- общие факторы (естественная резистентность клеток, температура тела, лихорадка, понижение pH среды, кислородное голодание);
- клеточные факторы (интерферон, фагоцитоз);

- гуморальные факторы (термолабильные и термостабильные ингибиторы).

Эволюция средств к клеточным рецепторам и неспецифическим ингибиторам сыворотки крови. Рецепторсвязывающая активность НА вирусов гриппа может ингибироваться различными молекулами, присутствующими в сыворотке и слизистых секретах. Эти ингибиторы на основании их термической стабильности, вируснейтрализующей активности, чувствительности к инаktivации нейраминидазой и обработкой периодатом калия классифицированы на типы α , β , и γ [обзоры 250, 326].

Ингибиторы β относятся к семейству коллектинов. Они представляют собой термолабильные Ca^{2+} -зависимые лектины, которые связывают обогащенные маннозой гликаны на глобулярной головке НА. Нейтрализуют вирус, создавая стерическое препятствие для НА в результате активации комплемент-зависимого пути [138]. Устойчивы к нейраминидазе и периодату калия. Присутствуют в сыворотках крови мышей, коров, кроликов, хорьков и морских свинок [137].

Ингибиторы α и γ - термостабильные гликопротеины, содержащие сиаловые кислоты, которые имитируют структуру клеточных рецепторов для вирусов гриппа и конкурентно блокируют рецепторсвязывающие участки НА. Вирусы гриппа нейтрализуются γ ингибиторами, но не нейтрализуются α ингибиторами, которые чувствительны к вирусным НА, чем отличаются от γ ингибиторов. Однако различия между α и γ ингибиторами штаммовзависимые и достаточно условны [250]. Установлено их присутствие у лошадей, морских свинок, кроликов, хорьков, свиней и человека [137, 326].

Ингибиторы γ являются $\alpha 2$ -макроглобулинами и наиболее хорошо исследованы как основные ингибиторы неиммунной сыворотки крови лошади и морской свинки. Они экспрессируют модифицированную 4-*O*-ацетил-*N*-ацетилнейраминовою кислоту, которая устойчива к гидролизу вирусной нейраминидазой и действует как мишень для связывания НА [451]. Макроглобулины сыворотки крови лошади и морской свинки содержат $\text{Sia}\alpha\text{-2,6Gal}$ -терминированные структуры. Такие лектины имитируют рецепторы клетки с $\alpha\text{-2,6}$ типом связи и избирательно ингибируют вирусы гриппа человека [109, 230, 383, 484]. Они блокируют RBS НА, препятствуя прикреплению вируса к рецепторам клетки или эритроцитов. Соответственно, для вирусов гриппа человека характерна чувствительность к сывороточным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, тогда как вирусы гриппа птиц и лошадей, преимущественно распознающие $\alpha\text{-2,3}$ рецепторы, устойчивы к ингибиторам лошадиной сыворотки [326, 383, 461].

Ингибиторы, присутствующие в сыворотке крови и других жидкостях организма, вероятно, оказывают влияние на выбор типа рецептора вирусами гриппа у естественных хозяев [383]. В частности, муцины человека содержат $\text{Sia}\alpha\text{-2,3Gal}$ -терминированные

последовательности, которые препятствуют продвижению вирусов с аналогичным типом рецепторов к клеткам [195].

Неиммунная сыворотка крови лошади является удобным инструментом для лабораторного анализа рецепторной специфичности вирусов гриппа в РТГА и в реакции нейтрализации. Однако, являясь сильным ингибитором гемагглютинирующей и инфекционной активности многих H2 и H3 вирусов человека, в соответствии с их α -2,6 рецепторной специфичностью, она не ингибировала ранние вирусы гриппа В и вирусы H1N1. По данным Rogers, 1983 [461] рецепторная специфичность HA H1, в отличие от HA H3, независимо от специфичности рецептора, не чувствительна к ингибированию лошадиной сывороткой, выявляя тем самым рецепторные особенности вирусов разных серотипов и родов. За счет сочетания специфичных мутаций возможно проявление двойственной α -2,3/ α -2,6 рецепторной специфичности, в таком случае также ингибирования не происходит [12].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что известные аминокислотные позиции, детерминирующие смену рецепторной специфичности вирусов разных серотипов, не являются исключительными, зачастую им сопутствуют, либо их замещают другие детерминанты в других позициях. Исследования современных вирусов гриппа человека, особенно H3N2, выявляют существенные различия в специфичности связывания.

Пандемии вирусов H1N1 и H3N2 начинались с «классического» переключения α -2,3 \rightarrow α -2,6 рецепторной специфичности в HA исходно птичьего происхождения. Дальнейшая длительная циркуляция вирусов H1N1 и H3N2 у человека привела в 1992 году к фенотипической реверсии, связанной с утратой способности агглютинировать куриные эритроциты и репродуцироваться в РКЭ. У вирусов гриппа H1N1 отсутствие агглютинации куриных эритроцитов ассоциировано с аминокислотными заменами в позициях 145, 186, 225, 193, 196 и 197 рецепторсвязывающего сайта HA [382, 403]. У изолятов H3N2 к прогрессирующей утрате способности агглютинировать куриные эритроциты привели наблюдающиеся с 1968 года замены в 226-й аминокислотной позиции HA Gln \rightarrow Leu \rightarrow Ile \rightarrow Val. Лабораторная адаптация таких H3N2 вирусов к росту в РКЭ приводила к мутациям Val-226-Ile и Leu-194-Ile в рецепторсвязывающем сайте HA, а также Ser-193-Arg, и усилению сродства к α 2,3 рецепторам [392]. Изменение в способности агглютинировать эритроциты вирусами H3N2 отмечено также при аминокислотной замене Glu-190-Asp [425].

Интересно, что с 2001 года авидность вирусов H3 человека к птичьим рецепторам снизилась, но при этом и сродство к рецепторам человека значительно уменьшилось [361]. Эти изменения рецепторного взаимодействия привели к сложностям в накоплении вирусов *in vitro* и с подбором вида эритроцитов для антигенного анализа. Кристаллическая структура аналогов рецепторов HA вирусов 2004-2005 года выделения выявила значительные различия в

конформации 220-й петли HA1 и изменение взаимодействия между HA и аналогом рецептора, что объясняет изменения в сродстве к рецепторам в сравнении с вирусом 1968 года. У вирусов, циркулирующих с 2005 года, выявлена ключевая детерминанта, определяющая снижение рецепторного взаимодействия – замена в HA1 Asp-225→Asn, причем изменение в позиции 225 происходило постепенно: в 2001-2002 г. – Gly-225→Asp, которая сопровождалась заменой Trp-222→Arg; и в 2004-2005 г. появилась замена Asp-225→Asn, которая сопровождалась заменой Ser-193→Phe. Ключевая детерминанта рецепторной специфичности – в 226 позиции также продолжала меняться: до 2001 года – Leu-226→Val, а в 2004 году – Val-226→Pе. Ранние вирусы гриппа H3N2 имели преимущественное сродство к разветвленным сиалилированным гликанам, тогда как недавние изоляты предпочитали длинные полилактозаминные цепи терминированные сиаловыми кислотами [254]. На фоне снижения сродства к клеточным рецепторам вирусная HA замещает HA и вступает во взаимодействие с рецепторами. Это искажает антигенную характеристику изолятов в серологических реакциях, что неприемлемо при отборе актуальных штаммов в вакцину, поэтому требуется обработка вируса ингибиторами нейраминидазы [361].

У HA H3 вируса 1968 года оказалось значительно более высокое сродство к рецептору человека, чем у вирусов 2004 и 2005 годов выделения. Потеря авидности к рецепторам человека привела в последние 15 лет к заметному сокращению роли вирусов H3N2 в инфекционном процессе и снижению трансмиссивности. Современные эпидемии по тяжести не идут в сравнение с крупными эпидемиями 1968-1970, 1975-1976, 1989-1990, 1994-1995 и 1999-2000 годов, тем не менее вирусы H3N2 уже 48 лет продолжают пандемический цикл [254].

Что касается вирусов гриппа В, то клиническая картина вызываемых ими заболеваний варьирует от легкой инфекции верхних дыхательных путей до тяжелой пневмонии [161; 185]. Вирусы гриппа В «Викторианской» ветви, адсорбирующиеся на гликанах обоих типов, скорее могут быть причастны к тяжелым инфекциям с развитием бронхопневмоний и желудочно-кишечных заболеваний, чем вирусы ветви «Ямагата», прикрепляющиеся только к Sia α -2,6Gal гликопротеинам верхних дыхательных путей [546].

В лабораторных исследованиях накопление вирусов гриппа в РКЭ приводит к селективному отбору вариантов с аминокислотными заменами вблизи RBS молекулы HA. Все адаптированные к РКЭ варианты вирусов отличались от неадаптированных штаммов увеличением сродства к плазматической мембране клеток хориоаллантоисной оболочки (ХАО) РКЭ и способностью связывать ганглиозиды ХАО. Кроме того, не было уменьшения сродства к ингибиторам аллантоисной жидкости. Эти выводы свидетельствуют о том, что рост вирусов гриппа человека в РКЭ ограничен из-за неэффективного связывания с рецепторами клеток ХАО, и что ганглиозиды могут играть важную роль в прикреплении вируса и/или проникновении. Последствия аминокислотных замен при яичной адаптации на рецептор-

связывающие свойства вирусов включают (а) повышение связывания вируса с концевой Sia α -2,3Gal детерминантой за счет замены в позициях 190, 225 HA штаммов H1N1 и в позиции 186 штаммов подтипа H3N2;

(б) уменьшение стерического взаимодействия с более отдаленными частями Sia α -2,3Gal-содержащих рецепторов (за счет потери сайтов гликозилирования в позиции 163 у H1 HA и в 187 позиции в HA вирусов гриппа В); и (в) усиление ионных взаимодействий с отрицательно заряженными молекулами за счет смены заряда на конце HA (187, 189, 190 (H1), и 145, 156 (H3)). Одновременно с усилением связи с Sia α -2,3Gal-рецепторами, у всех адаптированных к яйцам вариантов снизилось их сродство к лошадиному макроглобулину [230].

Адаптация вируса гриппа В/Виктория/504/00 ветви «Ямагата» к эффективной репродукции в аллантоисной полости куриных эмбрионов была связана со сменой рецепторной специфичности и приводила к двум (Arg-162-Met и Asp-196-Tyr) или трем (Gly-141-Glu, Arg-162-Met и Asp-196-Tyr) аминокислотным заменам вблизи рецепторсвязывающего домена HA, что было вызвано переключением сродства к пента- и гептасахаридным линейным цепям в α -2,3 мотиве. Причем, аминокислотная замена в 196 позиции оказывала наибольшее влияние на изменение антигенных свойств вируса [367]. Также выявлялась замена в позиции 187, приводящая к утрате сайта гликозилирования, но не влияющая значительно на усиление сродства к рецепторам птичьего типа [230].

Анализ связывания гликанов предоставляет дополнительную информацию для отслеживания антигенной эволюции и тканевого тропизма вирусов гриппа.

Эволюция признака чувствительности вирусов гриппа к температуре репродукции. Изучение вирусов гриппа А и В, циркулирующих в сообществе, показало, что среди них существует достаточно обширная генотипическая и фенотипическая вариабельность [435]. В частности, были обнаружены варианты, отличающиеся по вирулентности.

Наблюдения, проводимые со времени открытия вирусов гриппа А и В до начала 70-х годов 20-го века свидетельствовали, что все вирусы гриппа, включая возбудителей эпидемий гриппа H1N1 1930-40х годов, H2N2 и родоначальников пандемии H3N2 способны репродуцироваться при повышенных температурах [30, 78, 107, 111, 197, 272, 455]. Многочисленные свидетельства привели к однозначному заключению о том, что циркулирующие вирусы гриппа человека всегда обладают устойчивостью к повышению температуры инкубации, что определяет их вирулентность, позволяя успешно противостоять защитным факторам организма [107]. Было установлено, что предельно допустимая верхняя ограничительная температура репродукции вирусов гриппа А в РКЭ – 40°C, а у вирусов гриппа В – 38°C.

Температурочувствительные мутанты вируса гриппа являются в первую очередь объектом интереса при разработке аттенуированных реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Полученные лабораторным путем *ts* вирусы всегда аттенуированы для человека, и лабораторная адаптация к низким температурам стала успешным методом создания вакцинных штаммов [5, 124, 372].

Впервые факт обнаружения природного температурочувствительного вируса гриппа отмечен в 1973 году, когда из популяции температуроустойчивого эпидемического вируса А(Н3N2) при культивировании в РКЭ, без специальной адаптации, был выделен *ts* клон [188]. Следом за этим исследованием, факты широкой циркуляции штаммов сероподтипа А(Н3N2), характеризующихся несвойственной для эпидемических вирусов прежних лет температурочувствительностью репродукции при 40°C, были обнаружены в период эпидемии 1975-1976 гг. [104, 434]. В эпидемический период 1977-78 года 17 из 26 изолятов сероподтипа Н1N1 и 2 из 11 изолятов Н3N2 имели *ts* фенотип. При этом вирусы, изолированные в одном городе и даже от одного индивидуума, значительно варьировали по признаку температурочувствительности. Вирус Н1N1 с предельно допустимой температурой репродукции 38°C в МДСК был частично аттенуирован для человека. *ts* мутант, с ограничительной температурой репродукции 37°C, был еще более аттенуирован в тесте на волонтерах. Был сделан вывод о том, что появление в природе вирусов с *ts* фенотипом, наряду с *non-ts*, означает, что вирусы варьирующей вирулентности даже из одного сероподтипа, естественно социркулируют в сообществе [434].

Штаммы, отличающиеся по температурочувствительности, были исследованы на волонтерах, не имеющих антител к этим возбудителям и другими авторами [188]. Исследования подтвердили, что температурочувствительные вирусы Н1N1, у которых верхняя ограничительная температура репродукции не превышала 38°C, вызывали легкие инфекции, тогда как изолят с предельно допустимой температурой репродукции 39°C был значительно более реактогенным. Авторы тоже сделали вывод о широком распространении в популяции вирусов гриппа различающихся по температурочувствительности и, вероятно, различной вирулентности.

Дальнейшие исследования обнаружили, что пропорция *ts* вирусов неуклонно возрастала с годами наблюдения, так в 1949 – 1957 годах *ts* вирусы составляли 8,3% от всех исследованных изолятов сероподтипа Н1N1, тогда как в 1979 - 1980 годах они составили 82,4% популяции вирусов Н3N2 [188].

Молекулярные основы температурочувствительности лабораторных штаммов связаны с функционированием генов полимеразного комплекса, о чем пойдет речь в главе 3. Исследований молекулярных механизмов, лежащих в основе проявления

температурочувствительности циркулирующими сезонными вирусами гриппа человека, не проводилось.

Такие исследования были проведены на вирусах птиц, которые функционируют при высоких температурах (41,5°C) кишечника хозяина. Реконструирование функционального рибонуклеопротеина *in vivo* позволило обнаружить, что полимеразные комплексы вирусов птиц чувствительны к понижению температуры до 33-37°C, характерной для клеток млекопитающих. Снижение способности полимеразного комплекса вирусов птиц к репликации при 33°C определялось аминокислотным остатком PB2 627 [381]. Подобные исследования рекомбинантов между вирусами птиц и человека, полученных генно-инженерными методами, показали, что комплекс РНП вируса H5N1, в который был инкорпорирован белок PB2 от вирусов человека H1N1pdm2009 или H3N2 повышал полимеразную активность в клетках человека. А единичная аминокислотная замена в белке PB2 627Lys вируса H5N1 влияла на проявление температурозависимого механизма в активности полимераз. К температурозависимому механизму регуляции транскрипции и репликации была причастна также замена PB2 Glu158Gly.

В других экспериментах исследовались детерминанты, не позволяющие вирусам человека реплицироваться при повышении температуры до 41°C [242]. Авторы установили, что при непермиссивных температурах блок репродукции вирусов наступает в поздних стадиях репликационного цикла. И хотя все вирусспецифические компоненты (вРНК, кРНК, белки) продуцируются, созревания инфекционных частиц не происходит. В случае с вирусами A/FM/1/47 (H1N1) и A/Eq/Miami/63 (H3N8) не происходило почкования. У вируса A/PR/8/34 (H1N1) при 41°C продуцировались гемагглютинирующие неинфекционные нитевидные частицы, длиной до 6 μm , в которых было существенно снижено содержание белков NP и M.

Среди вирусов H7N1, патогенных для цыплят, был выявлен один штамм, чувствительный к температуре 41,5°C, патогенность его также была снижена. Анализ реассортантов между этим штаммом и высокопатогенным вариантом продемонстрировал, что снижение патогенности связано с мутацией в позиции 1561 гена PB2, приведшей к аминокислотной замене Pe512Leu [391].

Во всех описанных исследованиях чувствительность вирусов к температуре репродукции обусловлена мутациями в полимеразном белке PB2. Анализ изменчивости биологических свойств вирусов гриппа приближает к пониманию возможных путей его эволюции для разработки рациональных методов предупреждения распространения вирусов и вызываемой ими заболеваемости.

ГЛАВА 3 ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ АТТЕНУИРОВАННАЯ РЕАССОРТАНТНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

3.1 ВАКЦИНАЦИЯ КАК ПРОФИЛАКТИКА ГРИППОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Вирус гриппа вызывает одну из самых массовых респираторных инфекций, сопровождающуюся общей интоксикацией организма и бактериальными осложнениями. Современная стратегия борьбы с гриппозной инфекцией заключается в развитии глобальной сети эпидемиологического надзора [562], методов быстрой диагностики, профилактической вакцинации населения и использовании противовирусных препаратов. [587].

В рекомендациях Европейского центра по контролю заболеваемости подчеркивается, что вакцинация является основным, наиболее эффективным методом профилактики тяжелого и осложненного течения гриппозной инфекции, даже в случае, если прививка окажется менее эффективной, чем ожидалось [214].

ВОЗ рекомендует ежегодную вакцинацию в первую очередь наиболее уязвимых контингентов. Особую группу риска представляют дети, поскольку частота респираторных вирусных инфекций и гриппа у них в 10 раз превышает заболеваемость взрослых, а среди детей-дошкольников этот показатель в 16 раз выше [72, 164]. Кроме того, организованные в коллективы дети, являются основными распространителями респираторных вирусных инфекций. К группе риска относятся также пожилые и страдающие хроническими сердечно-легочными заболеваниями лица [566]. Люди, по роду деятельности взаимодействующие с большими контингентами населения, также являются наиболее уязвимыми.

В отсутствии изменчивости иммунитет к возбудителю гриппа сохраняется длительно. В частности, это подтвердилось в 1977 году, когда вновь, после исчезновения на 20 лет, начал циркулировать вирус серотипа А (H1N1). Лица, инфицированные вирусом гриппа А (H1N1) в 1950-х годах, были устойчивы к вирусу 1977 года [310, 468, 608].

Однако борьба с гриппом осложнена постоянным антигенным дрейфом вируса и периодическими событиями реассортации, что позволяет ему уклоняться от иммунитета, индуцированного предыдущей инфекцией или иммунизацией. Общим явлением при дрейфе и шифте является антигенная изменчивость гемагглютинина и нейраминидазы. Действие же современных лицензированных гриппозных вакцин направлено на стимулирование иммунного ответа именно к этим основным антигенам вируса, поэтому непрерывная антигенная эволюция вирусов гриппа вынуждает пересматривать состав сезонных вакцин ежегодно, причем отдельно для Северного и для Южного полушария [560].

«Золотым стандартом» могла бы стать универсальная гриппозная вакцина. Исследуется много подходов к созданию такой вакцины, которая должна обеспечивать перекрестную защиту против подверженных дрейфу и шифту вирусов. Основаны эти подходы на распознавании потенциальными вакцинами антигенов стабильных белков вирусов или их фрагментов. Однако многолетние попытки создания универсальной вакцины пока не увенчались успехом, что свидетельствует о сложности задачи [433].

С 1977 года гриппозные вакцины являются трехкомпонентным препаратом, в который входят вакцинные штаммы к циркулирующим вирусам А (H1N1), А (H3N2) и В. Поскольку с 2004 года одновременно циркулируют две антигенно различные линии вируса гриппа В - «Виктория» и «Ямагата», то с эпидемического сезона 2013/2014 гг., лицензировано применение квадριвалентной вакцины, в состав которой наряду с серотипами А (H1N1), А (H3N2), включены обе линии вируса гриппа В [463].

Гриппозные вакцины, живые (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ), начали разрабатывать сразу после установления вирусной природы заболевания (с 1936/37 гг.), причем в России преимущество имели пассажные ЖГВ, а в США - ИГВ. Оба вида вакцины имеют свою нишу применения. Производимые современные лицензированные живые и инактивированные вакцины представлены в таблице 3.1.

Ответ на вакцинацию живой или инактивированной вакциной частично зависит от иммунного статуса вакцинируемого, что является результатом истории его прежних встреч с вирусом гриппа. В частности, дети, которые прежде не имели встреч с вирусом гриппа, характеризуются лучшим иммунным ответом на ЖГВ, чем взрослые. У серонегативных детей сывороточные IgA и IgG антитела к HA, в ответ на иммунизацию ЖГВ, имели более высокие показатели, чем на ИГВ [299].

Низкий уровень сывороточных антител у детей и серонегативных взрослых, вырабатываемых в ответ на введение ИГВ, является причиной необходимости двукратной иммунизации, тогда как для серопозитивных лиц достаточно одной дозы [588]. Обратная зависимость наблюдается у вакцинируемых взрослых, которые имели прежде встречи с вирусом гриппа, у них инактивированная вакцина более иммуногена.

Многие различия между ответом на вакцинацию ЖГВ или ИГВ у взрослых и детей можно объяснить следующим. Поскольку репликация ЖГВ в респираторном тракте может быть частично ограничена у взрослых из-за предсуществующего иммунитета к родственному сезонному вирусу гриппа, живая вакцина реплицируется в более высоких титрах и в течение более длительного периода времени у серонегативных лиц по сравнению с серопозитивными [409, 589]. По этой причине ЖГВ

Таблица 3.1 – Лицензированные вакцины для профилактики сезонного гриппа

Тип вакцины	Тип препарата (адьювант)	Репродуктивная система	Способ введения
Инактивированная	Цельновирионная. Неразрушенные высокоочищенные вирионы	РКЭ	в/м
	Субвирионная; субъединичная, состоит из белков НА и NA	РКЭ, MDCK	в/м, и/д, в/м
	Сплит	РКЭ, VERO	в/м
	Цельновирионная (соли алюминия)	РКЭ	в/м
	Субъединичная (MF-59)	РКЭ	в/м
	Виросомальная	РКЭ	в/м
Живая аттенуированная	Цельный живой реассортантный вирус на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) или В/СССР/60/69	РКЭ	и/н
	Цельный живой реассортантный вирус на основе доноров аттенуации А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) или В/Энн Арбор/1/66	РКЭ	и/н

в/м – внутримышечно; и/д – интрадермально; и/н – интраназально.

является гораздо большим антигенным стимулом для детей, чем для взрослых. И наоборот, у лиц с предсуществующим опытом встречи с родственным антигеном, ответ антител на ИГВ более высокий, поскольку этот иммунный ответ является вторичным, бустерным. Из этого объяснения логически вытекает преимущество ЖГВ в качестве пандемической вакцины, когда в ответ на вакцинацию, как и на заболевание, вырабатывается первичный иммунный ответ. [570].

Использование ИГВ в качестве сезонных вакцин обосновано для серопозитивных взрослых и страдающих сердечно-легочной патологией лиц, у которых в ответ на внутримышечное введение вакцины вырабатываются сывороточные гуморальные антитела к непосредственно введенным штаммам вируса.

3.2 ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННОЙ РЕАССОРТАНТНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

3.2.1 РАЗРАБОТКА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ В РОССИИ

Первые ЖГВ были предложены в 1937 году А.А. Смородинцевым [504]. Эти вакцины представляли собой мутанты круга хозяев (host-range) – пассажные варианты «дикого» вируса на легочной ткани белых мышей, а после 1947 года – в РКЭ. [31].

Холодоадаптированные вакцины успешно использовались в период с 1957 по 1972 годы. [5]. Длительность пассирования для достижения необходимого уровня аттенуации варьировала от штамма к штамму, поэтому сложно было определить сколько пассажей должен пройти вирус, чтобы сохранить иммуногенные свойства, но при этом приобрести достаточную безвредность. Детский вариант ЖГВ, для гарантированной аттенуации, дополнительно длительно пассировали при пониженной до 25°C температуре, зачастую в ущерб иммуногенным свойствам препарата. Позже такие штаммы были получены также в США [370].

Существенным достижением стала разработка реассортантных аттенуированных живых гриппозных вакцин (ЖГВ). Стратегия получения аттенуированных реассортантных ЖГВ основана на природных особенностях вируса гриппа – фрагментированности генома и высокой способности к реассортации [192]. Целью реассортации является получение гибридных штаммов, у которых гены, кодирующие гликопротеины оболочки гемагглютинин и нейраминидазу, наследуются от вирулентного антигенно актуального штамма, а гены, кодирующие внутренние белки вириона, происходят от вируса-донора аттенуирующих свойств (формула генома 6:2). Целью аттенуации является устранение патогенности вируса при сохранении хорошей репликативной способности, чтобы вакцинный вирус индуцировал стабильный и многофакторный иммунный ответ, аналогичный иммунитету на естественную инфекцию, но при этом, в отличие от вируса «дикого» типа, не приводил к заболеванию.

В настоящее время применяются две аттенуированные реассортантные ЖГВ: Российская сезонная ЖГВ (производится НПО Микроген, торговая марка Ультравак®), она лицензирована в России, Индии, Таиланде [338, 473] и американская (США, производство MedImmune, торговая марка FluMist®) лицензирована в Америке в 2003 году и с 2012 года Европе (торговая марка Fluenz®) [145, 375].

Россия (СССР) является пионером в разработке реассортантных ЖГВ на основе лабораторно полученных доноров аттенуации. Реассортантные ЖГВ исследуются в России с 1977 года. Клинико-эпидемиологическая оценка безвредности отечественной ЖГВ по показателям реактогенности, уровню соматической и инфекционной заболеваемости в поствакцинальный период и расширенное клинико-иммунологическое изучение побочного

действия препаратов проводились в совместных исследованиях вирусологических центров: ФГБНУ «ИЭМ», ФГБНУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, ГИСК им. Л.А.Тарасевича, CDC (США), Институт биотехнологии (Куба), Newcastle University, RMIT University (Австралия), Pirbright, Salisbury (Великобритания). [119, 120, 121].].

Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования, а также применение ЖГВ в практике здравоохранения показали ее безвредность и высокую профилактическую эффективность. [11, 19, 20, 106, 119, 120, 121, 159, 323, 470, 469].

В 1987 году реассортантная аттенуированная ЖГВ зарегистрирована как препарат для профилактики гриппа у взрослых и детей. К настоящему времени более 75 миллионов взрослых и детей были вакцинированы российской ЖГВ [268].

Обе ЖГВ – отечественная и американская созданы по единому принципу: они являются аттенуированными реассортантными штаммами. Основу их составляют доноры аттенуации (*att* штаммы).

3.2.2 РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ДОНОРОВ АТТЕНУАЦИИ

Доноры аттенуации адаптированы к репродукции при пониженной температуре 25-26°C и ограничены в репродукции при повышенной температуре 38-39°C. Поэтому репликация вакцинных штаммов происходит в верхних дыхательных путях и не может опускаться в нижние отделы респираторного тракта. [590].

Донор аттенуации для отечественной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) получен путем серийных пассажей вируса А/Ленинград/134/57 (H2N2), выделенного от больного ребенка осенью 1957 года в Ленинграде в период пандемии "азиатского" гриппа. По антигенным свойствам этот вирус идентичен эталонному пандемическому вирусу А/Сингапур/1/57 (H2N2). Вирус был выделен в РКЭ, инкубированных при температуре 32°C.

Донор аттенуации В/СССР/60/69 получен на основе эпидемического вируса, выделенного в Москве в период эпидемии 1969 года также на РКЭ при температуре 32°C.

Длительное последовательное пассирование вирусов А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/69/60 вначале при оптимальной, а затем при пониженной температуре способствовало полному устранению вирулентных свойств исходных эпидемических вирусов, которые характеризуются отсутствием реактогенности и безвредностью для взрослых и для детей. Оба вируса пассировали в РКЭ сначала при оптимальной температуре 32°C. Вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) прошел 21 пассаж в этих условиях, вирус В/СССР/60/69 - 17 пассажей. Затем вирусы были подвергнуты адаптации к условиям размножения при пониженной до 25°C температуре инкубации в РКЭ. Вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) был

пассирован 17 раз при температуре 25°C, вирус В/СССР/60/69 прошел 60 пассажиров при 25°C [5, 133, 311].

До 2003 года в качестве донора аттенуации для детской ЖГВ использовался вирус А/Ленинград/134/47/57 (H2N2), который прошел 30 дополнительных пассажиров в РКЭ при 25°C. Позже стали использовать единый донора аттенуации для детской и взрослой ЖГВ [25].

Доноры аттенуации для американской ЖГВ были независимо разработаны по такому же принципу, что и российские. «Дикий» вирус А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) исходно обладал *ca* фенотипом, возможно из-за продолжительного лабораторного культивирования [369, 370], он характеризовался способностью к репродукции как при 25°C так и при 39°C и был аттенуирован для хорьков [272, 273]. Дальнейшая холододовая адаптация проводилась посредством постепенного снижения температуры инкубации с 33°C до 25°C в серии пассажиров в первичной культуре почки эмбриона кур (СЕК) до достижения высокого титра репродукции, что привело к закреплению множественных повреждений в геноме [372].

Сходный метод был применен для холододовой адаптации будущего донора аттенуации на основе «дикого» вируса В/Энн Арбор/1/66 [547].

Все *ca* доноры характеризовались также температурочувствительностью и аттенуацией для хорьков. Было установлено, что генетические повреждения, ответственные за *ca/ts/att* фенотип локализованы в генах, кодирующих внутренние белки доноров аттенуации [197]. Существенно, что *ts* фенотип, ограничивающий репродукцию доноров клетками верхних дыхательных путей, был ассоциирован с аттенуацией и безопасностью вакцин [273, 317].

Установлено, что А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отличается от своего «дикого» предшественника наличием 8 кодирующих мутаций во внутренних генах PB2 (табл. 3.2). А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) по сравнению с А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) имеет 3 дополнительные мутации в генах PB2 (Ser-490-Arg), PB1 (Met-317-Ile), NP (Leu-341-Ile) [319].

Анализ одногенных реассортантов между донором А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и его «диким» предшественником показал, что мутации в генах полимеразного комплекса играют определяющую роль в аттенуации холодоадаптированного донора [322]. К формированию *ts* фенотипа, независимо друг от друга, приводили мутация в белке PB2 и 2 мутации в белке PB1. Воссоздание донора А17 методами RG с помощью плазмидной технологии и замена специфичных для донора повреждений на последовательности, характерные для исходного «дикого» вируса, позволили подтвердить и конкретизировать роль каждой мутации в проявлении *ts* фенотипа [289]. Определяющая роль в проявлении *ts* фенотипа связана с мутациями PB2⁴⁷⁸ и PB1²⁶⁵, в то же время не было выявлено видимого влияния на аттенуацию холодоадаптированного вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) приобретенных донором мутаций в генах, кодирующих M1, M2 и неструктурный NS1 белки [57, 289], но показано, что

добавочный минорный вклад в температурочувствительность привносят мутации PB1⁵⁹¹ и NS2¹⁰⁰ [289].

Секвенирование шести внутренних генов донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) выявило в них 10 значащих замен, приводящих к аминокислотным заменам во внутренних белках (табл. 3.2) [296].

Выяснение генетической основы *ts*-фенотипа холодоадаптированного вируса А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) проводили с помощью методов обратной генетики [296]. В результате направленного мутагенеза был получен ряд рекомбинантных вирусов на основе донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60са (H2N2), в состав генома которого были включены отдельные гены от его «дикого» предшественника. Изучение вклада отдельных мутаций вируса А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) в аттенуацию подготовленных на его основе вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины MedImmune продемонстрировало ведущую роль в формировании температурочувствительного фенотипа мутаций в генах PB2⁸²¹, PB1^{1195, 1766, 2005} и NP¹⁴⁶.

Комбинация в геноме реассортантов трех мутантных генов от донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60са (H2N2), ответственных за проявление *ts* фенотипа (PB2 + PB1 + NP), приводила к статистически достоверному усилению температурочувствительности, сравнимому с уровнем температурочувствительности самого донора аттенуации [296]. Аналогичные результаты были продемонстрированы и в работе [322]. В этом случае для достижения уровня температурочувствительности, сопоставимого с *ts* фенотипом холодоадаптированного вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), было достаточно включения в состав генома дикого предшественника А/Ленинград/134/57 двух мутантных полимеразных генов от донора аттенуации – PB2 и PB1. Сочетание же полимеразных генов PB2 + PA усиливало *sa* фенотип реассортантов. Эти результаты свидетельствуют о том, что в аттенуации холодоадаптированных штаммов решающее значение имеют не только отдельные мутантные гены полимеразного комплекса, но и их синергизм.

Все кодирующие мутации, обнаруженные во внутренних генах холодоадаптированного штамма А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) [197], расположены в позициях, отличных от сайтов мутаций в геноме холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [319]. Не выявлено совпадений по локализации мутаций и в геноме экспериментального холодоадаптированного донора А/Сингапур/1/57са (H2N2), подготовленного в культуре клеток Vero, а также на основе возбудителей «азиатского» гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) [462], А/Краснодар/101/35/59 [129] и А/Москва/21/17/65 [27]. Это указывает на полигенный характер возникающих в процессе холодной адаптации мутаций, часть из которых приводит к аттенуации (табл. 3.2). В то же время введение в полимеразные гены «дикого» вируса А/PR/8/34 (H1N1) четырех мутаций, обеспечивающих аттенуирующий фенотип холодоадаптированного донора аттенуации

А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) (в PB2 – аминокислотную замену Asn–265–Ser, а в PB1 замены Lys–391–Glu, Glu–581–Gly и Ala–661–Thr), привело к формированию *ts* фенотипа и аттенуации для хорьков у модифицированного вируса А/PR/8/34 (H1N1) [297]. Подобные результаты были получены и при введении в «дикий» вирус А/PR/8/34 (H1N1) специфичных для донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) *ts* мутаций [289], что является еще одним подтверждением роли в аттенуации мутаций, обнаруженных в генах полимеразного комплекса доноров.

Данные секвенирования и роли мутантных генов в проявлении *ts/ca/att* фенотипа холодоадаптированного вируса В/СССР/60/69 являются предметом исследования представляемой работы.

Что касается донора аттенуации В/Энн Арбор/1/66са, секвенирование шести генов, кодирующих внутренние белки, выявило в них ряд значащих замен, приводящих к 25 аминокислотным заменам – 4 в белке PB2, 6 в белке PA, 9 в белке NP, 2 в M1 белке и 1 в белке M2; белок NS не имеет кодирующих мутаций (табл. 3.2) [205]. Установлено, что за температурочувствительность (*ts* фенотип) донора аттенуации В/Энн Арбор/1/66са ответственны мутантные гены PA и NP [308]. Эти же гены в комбинации с M геном определяют *att* фенотип холодоадаптированного вируса В/Энн Арбор/1/66са [210, 211, 278].

3.2.3 СВОЙСТВА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Существующие методы получения ЖГВ включают различные технологии: создаются на основе классической реассортации эпидемического вируса с донором аттенуации в РКЭ (отечественная вакцина) или методами обратной генетики с использованием плазмид (FluMist®). Независимо от способа получения, штамм ЖГВ представляет собой реассортант, который наследует 2 гена, кодирующих основные антигенные детерминанты – HA и NA, от актуального эпидемического вируса, а 6 генов, кодирующих внутренние белки вириона от донора аттенуации. Реассортант с формулой генома 6:2, в результате объединения необходимых для вакцинного вируса характеристик приобретает эпидемиологическую актуальность и безвредность для человека.

Генетическая стабильность ЖГВ. Исключительно важным достоинством является способность аттенуированных ЖГВ сохранять генетическую стабильность. Поскольку теоретическую вероятность трансмиссивности вакцинных штаммов нельзя игнорировать, то стабильность ЖГВ должна сохраняться при репликации у контактных лиц. Неоднократно продемонстрировано, что репликация в доноров аттенуации в организме хозяина не приводит к возврату вирулентности вируса «дикого» типа. Сохранность аттенуирующих мутаций подтверждена при пассировании доноров А/Ленинград/134/17/57 и А/Ленинград/134/47/57

Таблица 3.2 - Мутации в генах, кодирующих внутренние белки лицензированных и экспериментальных доноров аттенуации

Гены	Лицензированные доноры аттенуации			Экспериментальные доноры аттенуации					
	A17 (H2N2) ¹ (Россия)	A/AA/6/60 ² (H2N2) (США, MedImmune)	B60/525 ¹ (Россия)	B/AA/1/60 ² (США, MedImmune)	A/Краснодар/ 101/35/59 (H2N2) [129]	A/Сингапур/ 1/57 (H2N2) – Vero [462]	A/Москва/ 21/17/65 (H2N2) [27]	A/Гонконг/ 1/68/162/35 (H3N2) [130]	B/Виктория/ 2/63/87 [129]
PB2	Val-487-Leu	Asp-265-Ser	Предмет исследования настоящей работы (глава 5)	Arg-78-Gln Met-183-Ile Val-269-Ile Ser-630-Arg	Val-290-Leu	Ile-185-Thr Arg-340-Ile	Met-202-Iso Val-114-Iso Gly-416-Ser	Glu-120-Asp Tyr-360-His Ile-584-Val	Arg-185-Lys
PB1	Lys-265-Asn Val-591-Ile	Lys-391-Glu Glu-457-Asp Glu-581-Gly Ala-661-Thr		Arg-433-Lys Ile-651-Val His-751-Tyr	Ile-147-Thr	Leu-419-Ile	Tre-723-Arg	Ala-374-Glu Arg-465-Gly Pro-627-Ser	Asp-120-Gly
PA	Leu-28-Pro Val-341-Leu	Lys-613-Glu Leu-715-Pro		His-160-Ser, Ser-272-Asn Val-431-Met Ile-495-Met Tyr-497-His Asp-590-Glu	Phe-707-Leu	Asn-228-Ile	-	Met-447-Ile Lys-673-Arg	Val-625-Ile
NP	-	Asp-34-Gly		Thr-55-Ala Ile-61-Asp Val-114-Ala Try-129-Phe Pro-410-His Ala-509-Thr Ile-531-Thr Asp-535-Glu Val-534-Ile	Glu-369-Val Ala-433-Val	-	-	Gly-102-Arg Glu-292-Gly	Pro-40-Ser
M1	Ile-15-Val	-		Met-183-Val His-159-Gln	Leu-103-Ile	Arg-101-Lys, Gln-158-His	Ala-182-Thr	Val-205-Ile Asp-293-Asn	Gly-23-Lys
M2	Ala-86-Thr	Ala-86-Ser		Gln-64-Lys	Ile-42-Val			Ile-33-Leu	
NS1	Met-100-Ile	Ala-153-Thr		-	-	-	Iso-65-Val	Ile-81-Met Lys-219-Glu	Gly-13-Ser

¹Доноры аттенуации для российской ЖГВ; ²Доноры аттенуации для ЖГВ MedImmune, США А/Энн Арбор/6/60 (H2N2), В/Энн Арбор/1/66.

через хорьков [548], а приобретенные донором А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) мутации, ответственные за *ts* фенотип, сохраняли стабильность на протяжении пассажей в культуре клеток почки цыпленка [272]. Стабильность генетических локусов является маркером стабильности вакцин. Сохранность аттенуирующих мутаций вакцинных штаммов также показана при исследовании изолятов от привитых лиц [470, 471, 474].

Для выработки иммунитета у привитых необходимо определение оптимальной инфекционной дозы и режима вакцинирования, чтобы вызвать специфический иммунитет против патогена. Потенциал ЖГВ обеспечивать защиту против инфекции должен подтверждаться в крупномасштабных исследованиях эффективности. Результаты таких исследований свидетельствуют, что аттенуированные ЖГВ безвредны и имеют наилучшие показатели в снижении заболеваемости и смертности от гриппозных патогенов [11, 106, 119, 120, 121, 159, 323, 470, 469].

Иммунный ответ на ЖГВ. Вводимая интраназально, ЖГВ имитирует естественную инфекцию и индуцирует те же звенья иммунитета, что и возбудитель гриппа. Наряду с системным гуморальным иммунным ответом (IgG), который для ЖГВ не столь выражен, в ответ на репродукцию ЖГВ в клетках слизистой носоглотки, во входных воротах инфекции индуцируются местные секреторные IgA антитела и стимулируется опосредованный клеточный иммунный ответ [136, 220, 400; 565]. При этом полноценность развития у людей поствакцинального иммунного ответа к возбудителям инфекций зависит от способности вакцинных штаммов индуцировать именно Т- и В-клеточную иммунологическую память, которая определяет защищенность организма при последующем его контакте с «диким» вирулентным патогеном [79, 81]. Холодоадаптированная ЖГВ аттенуированна, вызвать инфекцию в нижних отделах респираторного тракта она не способна из-за более высокой температуры в этих тканях [136].

Эффективность ЖГВ против дрейфовых вариантов вируса гриппа. Одним из преимуществ ЖГВ является ее способность вызывать перекрестную защиту против дрейфовых вариантов вируса гриппа. По данным клинических испытаний ЖГВ с учетом снижения числа острых респираторных заболеваний (ОРЗ) у привитых детей и взрослых, проведенных в 1986–2004 гг., эффективность вакцины варьировала в пределах 30–59% и зависела от степени антигенного родства между циркулирующими эпидемическими вирусами гриппа и штаммами, входящими в состав ЖГВ [3, 5, 20, 531].

Долговременная защита. В клинических испытаниях была продемонстрирована способность ЖГВ защищать от заболеваний гриппом в течение длительного промежутка времени (16 месяцев после вакцинации в сезон 1991–1993 гг.). Было показано, что 40% детей, вакцинированных ЖГВ в предшествующий сезон, были защищены и в следующем

эпидемическом сезоне, тогда как при иммунизации инактивированной вакциной (ИГВ) такой защиты не наблюдалось [20].

Неадаптивный иммунный ответ. Еще одним достоинством ЖГВ является способность защищать привитых вскоре после вакцинации, еще до выработки специфического приобретенного иммунитета. Было продемонстрировано снижение уровня заболеваемости ОРЗ у детей в первую неделю после вакцинации. Такой эффект может быть объяснен тем, что вирусы гриппа эффективно стимулируют продукцию α/β интерферона, а также значительно повышают активность НК-клеток на ранних стадиях вирусной инфекции [3, 20]. Иммунизация ЖГВ не вызывала аллергических реакций у здоровых детей и взрослых. У детей, вакцинированных ЖГВ, наблюдалось снижение уровня заболеваемости пневмонией и отитом на 40–50% [133].

Коллективный иммунитет. Способность ЖГВ вызывать защиту у непривитых детей была продемонстрирована при широкомасштабной иммунизации учащихся школ. Уровень такой защиты зависел от степени охвата вакцинацией в каждой школе. Что же касается ИГВ, то, в противоположность ЖГВ, было показано, что иммунизация ИГВ не приводила к формированию коллективного иммунитета [обзор 20]. При этом данные литературы свидетельствуют, что при вакцинации 80% маленьких детей, за счет создания коллективного иммунитета, заболевание гриппом невакцинированных лиц остальной популяции может быть снижено в 3 и более раза [16, 112].

Клинические преимущества и недостатки ЖГВ в сравнении с ИГВ. Преимущества: легкое безинъекционное введение распылением вакцинного препарата в нос; способность индуцировать более широкий иммунный ответ, и наряду с ним местный секреторный иммунитет; более дешевое и несложное производство; продуктивность на яйцо в 15–20 раз выше.

К недостаткам ЖГВ следует отнести возможность появления у вакцинного штамма адаптивных мутаций к репликации в РКЭ, что может привести к снижению репродуктивности вакцины в ВДП человека и ее иммуногенности, поэтому требуется проверка каждого лота вакцины перед распространением. Опасность контаминации посторонними биологическими агентами требует уровня лаборатории BSL-2 и использования дорогих SPF РКЭ.

В научной литературе встречаются опасения, что иммунизация людей ЖГВ может привести к распространению вакцинных штаммов в природе, их неконтролируемая циркуляция приведет к реассортации с «дикими» вирусами гриппа, а это чревато возможностью появления новых патогенных возбудителей. Это опасение не подтверждается практическими наблюдениями. По результатам многочисленных клинических исследований, проводимых с 1977 года [149, 378, 411, 423, 469, 470, 521], при тесном контакте привитых и не привитых лиц

передача вакцинных штаммов от вакцинированных лицам группы плацебо практически не происходит. Был зарегистрирован лишь единичный случай выделения штамма вакцины FluMist® от ребенка из группы плацебо [538]. При этом вакцинный штамм сохранил стабильные свойства и аттенуированный фенотип. В экспериментах на морских свинках продемонстрировано полное отсутствие трансмиссивности доноров аттенуации и вакцинных штаммов ЖГВ контактным животным. Смешанная инфекция *in vivo* «диких» и холодоадаптированных вирусов не приводила к формированию реассортантов, превышающих по своей вирулентности «дикие» родительские штаммы [28, 441].

Противопоказаниями к применению ЖГВ являются ранний детский возраст (в России до трех лет, в США – до двух лет); аллергия на куриный белок, поскольку в настоящее время ЖГВ разрешается производить только в РКЭ, нарушения иммунологического статуса. Стоит отметить, что в Индии российская ЖГВ разрешена детям с 2-летнего возраста. Фаза II слепого рандомизированного исследования трехвалентной сезонной российской вакцины на детях 24-59 месяцев (150 детей получили вакцину, 150 – плацебо) в Бангладеш подтвердила хорошую переносимость и безопасность вакцины для младшей возрастной группы [431].

3.2.4 ПАНДЕМИЧЕСКИЕ ЖИВЫЕ ГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ

Вирусы гриппа птиц и млекопитающих могут спорадически передаваться людям, вызывая варьирующие по тяжести вспышки заболеваний. Чаще всего устойчивой передачи вируса от человека к человеку не происходит, но в отдельных случаях трансмиссивность может закрепиться, в такой ситуации возникает высокая вероятность приобретения вирусом пандемических потенциалов. Подготовка к будущей пандемии – важная задача здравоохранения. Поскольку получение и производство вакцин требует времени, а заранее невозможно предвидеть какой вирус вызовет пандемию, ВОЗ поставила задачу проектировки, тестирования и производства эффективных потенциально пандемических вакцин для создания из них Национальных коллекций [573].

С целью организации планирования подготовки резервных вакцинных штаммов на основе вирусов гриппа с пандемическим потенциалом, Dr. R. Webster расположил циркулирующие среди млекопитающих и птиц вирусы гриппа А, которые проявили тенденции пересекать межвидовой барьер, по уровню приоритетности как возбудителей возможных пандемий [207.] (табл. 3.3). Была отмечена необходимость наблюдения за циркулирующей вирусом гриппа всех сероподтипов NA и NA и за их способностью трансмиссии к человеку.

Опыт применения ЖГВ к сезонным вирусам гриппа демонстрирует свойства, которые предполагают преимущество применения пандемических ЖГВ перед ИГВ: эффективность для

взрослых и детей, полноценный иммунный ответ на однократное введение, особенно на новый для иммунной системы антиген [312], перекрестную иммунную защиту между антигенно различающимися штаммами одного сероподтипа, промышленная продуктивность ЖГВ значительно превосходит ИГВ, легче и быстрее осуществим контроль качества, несомненным достоинством является также неинвазивное введение. Все это исключительно важно при необходимости экстренной вакцинации в условиях пандемической угрозы.

Таблица 3.3 – Потенциальные возбудители пандемий будущего

Уровень приоритета	Сероподтип вируса гриппа А	Обоснование
Высший	H1, H2, H3	Возбудители известных пандемий и тяжелых инфекций человека. (Вирусы сероподтипов H1 и H3 включены в обновляемые ежегодно сезонные вакцины)
Высокий	H5, H6, H7, H9	- были причиной инфекций у людей, устойчивой трансмиссивности от человека к человеку не наблюдается (H5, H7, H9); - были причиной и имеется устойчивая линия возбудителей инфекций домашних птиц (H6); - H7 и H9 были обнаружены у свиней
Ниже	H4, H10, H13	Были причиной транзиторных инфекций млекопитающих, включая свиней, и домашних птиц, включая кур
Низший	H8, H11, H12, H14, H15	- Изредка встречаются у наземных видов домашних птиц (H8, H11, H12); - редко встречаются даже среди диких водоплавающих птиц (H8, H14, H15)

К настоящему времени на основе российского и американского доноров аттенуации получены и изучены в доклинических и клинических исследованиях штаммы ЖГВ к имеющим пандемический потенциал вирусам гриппа птиц сероподтипов H5N1, H5N2, H7N3, H7N9 и вируса H2N2 [191, 290, 475, 476, 477, 478, 519, 520].

Все кандидатные штаммы на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и А/Энн Арбор/6/60са, полученные как методом классической реассортации, так и с помощью RG-плазмидной технологии, были безопасны, иммуногенны и защищали животных от челендж-инфекции гомологичным и гетерологичным вирусом. В клинических исследованиях потенциально пандемические ЖГВ показали себя безопасными и иммуногенными для взрослых волонтеров. Все ЖГВ хорошо репродуцировались в ВДП волонтеров, а изоляты были генетически стабильными и не передавались непривитым лицам группы плацебо.

Таким образом, многочисленные данные, накопленные к настоящему времени, позволяют сделать вывод о том, что холодоадаптированная живая гриппозная вакцина — оптимальный препарат для массовой вакцинации всех групп населения, и особенно детей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ. Высокая антигенная и генетическая изменчивость вирусов гриппа, возможность адаптации вирусов животных и птиц к человеку, особенности современного эпидемического процесса с одновременной циркуляцией вирусов гриппа А двух серотипов и вирусов гриппа В двух эволюционных линий — факторы осложняющие борьбу с гриппозной инфекцией.

При разработке эффективных реассортантных живых гриппозных вакцин для специфической профилактики заболеваемости решающее значение имеет понимание направленности процесса эволюции не только антигенных, но и ряда других биологических свойств эпидемических вирусов гриппа, и полная молекулярно-биологическая характеристика доноров аттенуации, которые являются лабораторно-полученными *ts/ca* мутантами.

Представляемое диссертационное исследование направлено на решение этих вопросов.

ГЛАВА 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы гриппа. В работе были использованы следующие вирусы гриппа А и В, полученные в Центре по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC, Атланта, США), из коллекции NIBSC (Великобритания), из коллекции отдела вирусологии им. А.А.Сморозинцева ФГБНУ «ИЭМ», из коллекции ФГБУ «НИИ Гриппа» МЗРФ:

- эпидемические штаммы разных лет выделения;
- эталонные эпидемические штаммы А (H1N1, H2N2, H3N2) и В и пандемические вирусы прошлых лет;
- штаммы живой гриппозной вакцины;
- изоляты от больных;
- А/Н5N1/PR8–RG реассортанты для инактивированных вакцин, полученные методами обратной генетики (RG): VN/1203/PR8–IBCDC–RG (VN–PR), Indo/05/PR8–IBCDC–RG (INDO–PR), NIBRG–23 (Turkey–PR), созданные на основе 6-ти генов, кодирующих внутренние белки, от вируса А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR/8/34) и генов НА и NA от вирулентных вирусов гриппа птиц H5N1: А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1), А/Индонезия/05/2005 (клайд 2.1) и А/индюк/Турция/1/2005 (клайд 2.2) соответственно. Область рестрикции гена НА, у вирусов А/Н5N1/PR8–RG генетически модифицирована: сайт-специфическим мутагенезом удален полиосновный мотив из 4-х аминокислот, что привело к снижению вирулентности:

A/VN/1203/2004	G L R N S P Q R E	R R R K K	R G L F
VN-PR8	G L R N S P Q R E	- - - - T	R G L F
		↓	
A/Indo/5/2005	G L R N S P Q R E	S R R K K R	G L F
INDO-PR8	G L R N S P Q R E	S R - - - -	G L F
		↓	
A/T/T/1/2005	G L R N S P Q R E	R R R K K	R G L F
NIBRG-23	G L R N S P Q R E	- - - -	R G L F

- доноры аттенуации для отечественной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, являющиеся собственностью ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт–Петербург).
- Реассортантный штамм ЖГВ А/17/Вьетнам/1203/04-RG (H5N1) на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), созданный методами обратной генетики на основе плазмидной технологии, собственность отдела вирусологии ИЭМ [257].

- В разных тестах также были использованы патогенные вирусы сероподтипа А (H5N1): А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1), А/Вьетнам/1194/2004 (клайд 1), А/Индонезия/5/2005 (клайд 2.1), А/лебедь-кликун/Монголия/244/2005 (клайд 2.2), А/индюк/Турция/01/2005 (клайд 2.2), А/горный гусь/Монголия/1/2005 (клайд 2.2), А/Аньхой /1/2005 (клайд 2.3) и вирусы А(H1N1)pdm09: А/Калифорния/07/2009, А/Северная Каролина/39/2009.

Полный список использованных штаммов вирусов гриппа представлен в Приложении, таблица Б1.

Все штаммы вирусов гриппа были выделены и накоплены в 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах.

4.2 ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.2.1 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Использовали развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) птицефабрики ООО «Племрепродуктор Назия» (Ленинградская область).

Вирусы инкубировали в 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Для накопления вируса инфицированные эмбрионы инкубировали при перmissive температуре 32-33°C; вирусы гриппа А – в течение 48 часов и вирусы гриппа В – в течение 72 часов.

В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали также при пониженной температуре 25-26°C (в течение 5-6 суток) и повышенных температурах, 37, 38, 39 и 40°C (в течение 2-3 суток), после чего эмбрионы охлаждали и собирали аллантоисную вирусосодержащую жидкость.

Титры вирусов рассчитывали по методу Reed & Muench [454] и выражали в lg ЭИД₅₀/мл.

Оптимальная доза заражения РКЭ для накопления биомассы вирусов соответствовала 3 lg ЭИД₅₀/0,2 мл.

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и повышенной до 37, 38, 39 или 40°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными, т.е. проявляющими *ts* фенотип, если эта разница (RCT – reproductive capacity at different temperatures) составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и температуроустойчивыми (*non-ts* фенотип), если RCT не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Если RCT находилась в пределах 3,5–4,5 lg ЭИД₅₀/мл, такие вирусы оценивали как «± *ts*» (табл.4.1).

Таблица 4.1 - Параметры оценки температурочувствительности (*ts* фенотип) и холодоадаптированности (*ca* фенотип) вирусов гриппа в опытах на РКЭ

RCT ₍₃₇₋₄₀₎	Фенотип
> 4,5 lg ЭИД ₅₀	<i>ts</i>
Между 3,5-4,5 lg ЭИД ₅₀	$\pm ts$
< 3,5 lg ЭИД ₅₀	<i>non-ts</i>
RCT ₂₅	Фенотип
> 4,5 lg ЭИД ₅₀	<i>non-ca</i>
Между 3,5-4,5 lg ЭИД ₅₀	$\pm ca$
< 3,5 lg ЭИД ₅₀	<i>ca</i>

Степень холодоустойчивости вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и пониженной до 25-26°C температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми, т.е. проявляющими *non-ca* фенотип, если RCT₂₅ составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и холодоустойчивыми (*ca* фенотип), если RCT₂₅ не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Если RCT₂₅ находилась в пределах 3,5–4,5 lg ЭИД₅₀/мл, такие вирусы оценивали как « $\pm ca$ ».

4.2.2 ПОЛУЧЕНИЕ АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ЖГВ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ РЕАССОРТАЦИИ В РКЭ

Согласно действующим в настоящее время требованиям ВОЗ выделение кандидатных штаммов и получение гриппозных ЖГВ проводится исключительно в развивающихся куриных эмбрионах. [570]. В соответствии с Российскими нормативными документами разработка реассортантных аттенуированных штаммов для ЖГВ должна осуществляться в РКЭ методом классической реассортации [115].

Реассортацию эпидемических вирусов, рекомендованных ВОЗ для получения вакцинных штаммов, с донорами аттенуации для отечественной ЖГВ проводили в 10-11 дневных РКЭ на основе стандартной методики [4] и с учетом современных требований ВОЗ. В зависимости от фенотипических характеристик эпидемического компонента скрещивания, в схему реассортации вводились модификации согласно собственным методическим подходам автора. Схема получения реассортантных штаммов для живой гриппозной аттенуированной вакцины (ЖГВ) в РКЭ представлена на рисунке 4.1. В соответствии со схемой, этапы получения вакцинных штаммов включают в скрещивание при 32°C родительских вирусов (*ts/ca* донора аттенуации и эпидемического

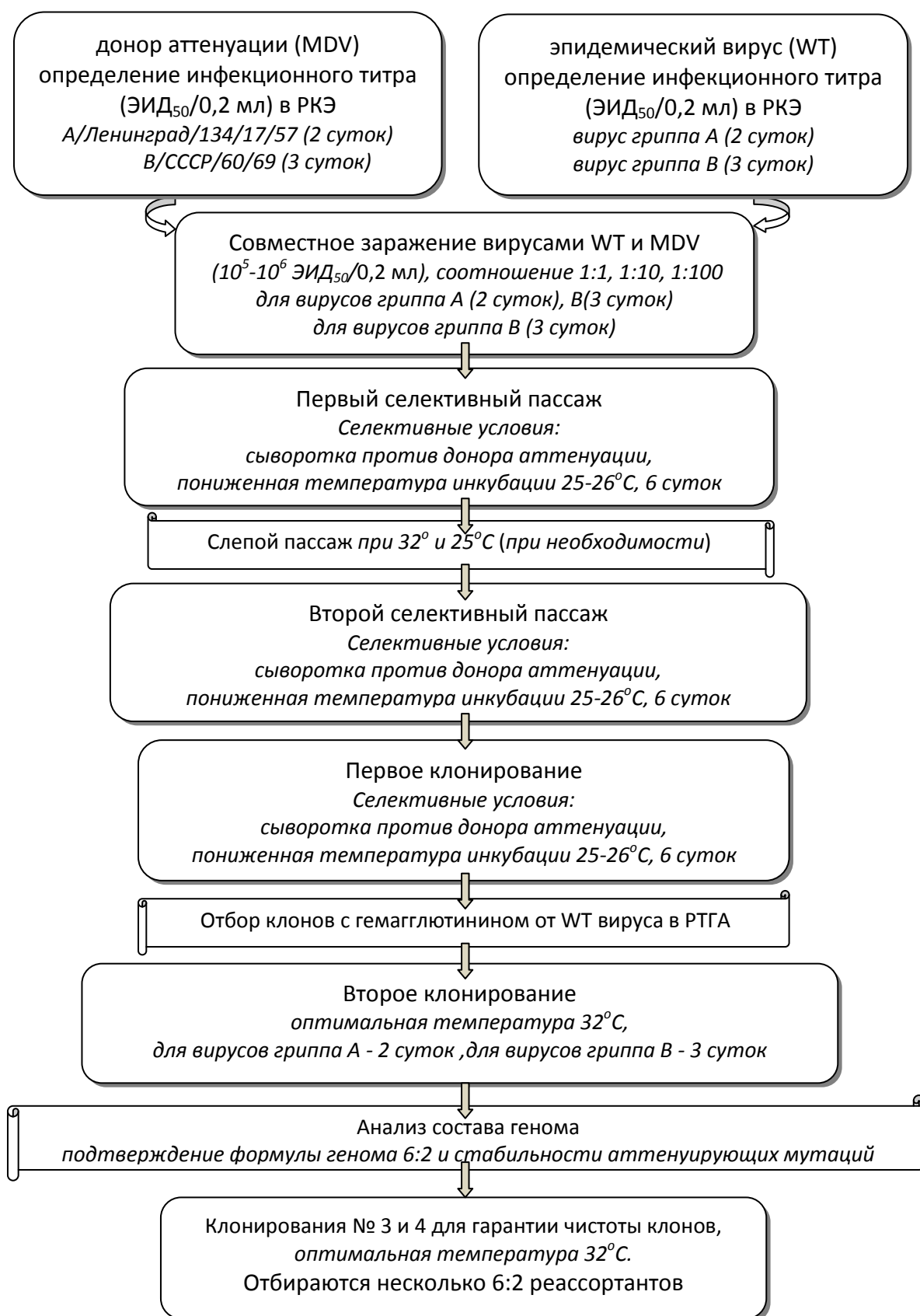


Рисунок 4.1 - Схема получения реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины

вируса, селективные пассажи при пониженной до 25°C температуре инкубации в присутствии селектирующего фактора – антисыворотки против донора аттенуации и клонирование реассортантов предельными разведениями.

Первое клонирование проводится при пониженной до 25-26°C температуре, которая является вторым селектирующим фактором, создающим преимущества для воспроизводства клонов, обладающих температурочувствительностью и холодоадаптированностью. Такой метод селекции позволяет получить реассортанты, обладающие генами, кодирующими антигены HA и NA вируса от актуального эпидемического родителя, а гены, кодирующие внутренние белки, от штамма донора аттенуирующих свойств, так называемая «формула генома 6:2», чем гарантируется безопасность реассортанта.

Второе клонирование проводится при оптимальной температуре, после чего клоны исследуются в РТГА на принадлежность HA эпидемическому компоненту скрещивания, проверяется соответствие *ts* и *ca* фенотипа донору аттенуации.

Предварительный анализ состава генома методом RFLP (Restriction fragment length polymorphism, RFLP assay) [38, 320], модифицированного нами с учетом генетической эволюции вирусов, или модифицированного нами метода мультиплекс («да-нет»)-ПЦР позволяет отобрать клоны с требуемой формулой генома 6: 2.

Одно-два последующих клонирования обеспечивают чистоту перспективных клонов.

Секвенирование генома осуществляется с целью подтверждения сохранности аттенуирующих мутаций в генах внутренних белков и отсутствия дополнительных нежелательных мутаций.

В итоге отбирается клон, соответствующий требованиям на вакцинные штаммы по фенотипическим, ростовым и молекулярно-генетическим характеристикам.

Следующим этапом является накопление отобранного 6:2 клона (pre-Master Virus Seed, pre-MVS – предварительного посевного вакцинного реассортанта) при оптимальной температуре инкубации с целью получения маточного (посевного) материала вируса (MVS). После проверки на стабильную сохранность аттенуирующих мутаций MVS передается в производство. Сохранность *ts/ca* фенотипа и генетическая стабильность проверяется повторно после пяти последовательных пассажей 6:2 реассортанта в РКЭ при оптимальной температуре.

Для подтверждения соответствия генома реассортанта вакцинной формуле 6:2 проводится генетическая характеристика pre-MVS.

Частичная инактивация вируса светом ультрафиолетового (УФ) спектра. В отдельных исследованиях, для получения реассортантов с вакцинной формулой генома на основе вирусов гриппа птиц А (H5N1), проводили частичную инактивацию родительского вируса светом ультрафиолетового спектра. Для снижения инфекционного титра вируса А (H5N1)-PR8 на 6 lg

ЭИД50/мл использовали высокочастотный ультрафиолетовый излучатель мощностью 15 ватт. Обработку вируса проводили с расстояния 20 см в течение 20 секунд, медленно покачивая тонкий слой вирусосодержащей аллантаоисной жидкости в открытой чашке Петри, согласно методу [480]. Остаточную инфекционность вируса определяли титрованием в куриных эмбрионах.

4.2.3 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

В работе была использована перевиваемая линия клеток MDCK (линия NBL-2), полученная из CDC (Атланта, Джорджия, США). Клетки инкубировали при 37°C 3 суток в атмосфере 5% CO₂ в 96-луночных полистироловых планшетах фирмы «Costar», посевная доза составляла 3 x 10⁴ клеток/лунку в 100 мкл среды RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, Юта, США). Через 3 суток среду удаляли, клеточный монослой дважды отмывали раствором Хенкса и вносили исследуемые штаммы вирусов гриппа. Вирусы выращивали в среде с добавлением 0,6 мкг/мл трипсина ТРСК. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса гриппа в культуре клеток MDCK оценивали визуально после 48-72 часов инкубации при 33°C.

4.3 СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обработка сывороток. Гипериммунные крысиные и кроличьи сыворотки, используемые при получении штаммов ЖГВ и перед постановкой РТГА, для удаления неспецифических ингибиторов вируса гриппа обрабатывали разрушающим рецепторы ферментом RDE (receptor–destroying enzyme производства Denka–Seiken, Tokyo, Japan) с последующим прогреванием при 56°C, 30 минут в соответствии с протоколом производителя.

Неиммунные сыворотки крови лошади и морской свинки, использовавшиеся в РТГА или в реакции нейтрализации для оценки чувствительности вирусов гриппа к неспецифическим сывороточным ингибиторам, разводили в 10 раз стерильным физиологическим раствором и прогревали в течение 5 минут при 80-100°C.

Использовали лошадиную сыворотку производства ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, и сыворотку неиммунизированных морских свинок разведения питомника «Рапполово».

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Определение антигенной принадлежности НА штаммов вируса гриппа проводили в соответствии с Методическими указаниями [560] со специфическими иммунными крысиными сыворотками, используя 4 АЕ антигена и 1% взвесь эритроцитов кур или человека 0(I)Rh+. Титры антигемагглютинирующих антител выражали как

величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение гемагглютинации.

Вакцинный реассортант должен взаимодействовать в РТГА с гомологичной сывороткой к эпидемическому родительскому вирусу, которой полностью нейтрализуется. Вакцинный реассортант не должен давать перекрестных реакций с сывороткой к донору аттенуации.

Оценка ингибиторочувствительности вирусов гриппа к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови проводилась в стандартной РТГА с 1%-ми куриными или эритроцитами человека группы 0(I) Rh⁺, используя в качестве источника ингибиторов неиммунную сыворотку крови лошади или морской свинки. В реакции используется способность вирусов гриппа агглютинировать эритроциты, а ингибиторов сыворотки крови – препятствовать этому. Среди прочих сывороток животного происхождения лошадиная сыворотка обладает наибольшим набором термостабильных неспецифических ингибиторов вирусов гриппа [110]. В ряде исследований использовали также богатую ингибиторами неиммунную сыворотку крови морских свинок.

Вирусы считали ингибитороустойчивыми (*ir*) при титре лошадиной сыворотки в РТГА $\leq 1:40$ и ингибиторочувствительными (*is*) при титре $\geq 1:80$.

В качестве контролей использовали референс-вирусы, заведомо известные как ингибитороустойчивые или ингибиторочувствительные.

4.4 ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Работа с животными проводилась в соответствии с Руководством по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [128], с Методическими рекомендациями по доклиническим испытаниям эффективности и безопасности новых иммунобиологических лекарственных препаратов [80] и с Правилами лабораторной практики [113] и была одобрена локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ». Использовали здоровых животных, содержащихся на регламентированном пищевом рационе, которые ранее не использовались для проведения каких-либо испытаний. Исходную массу животных определяли и регистрировали в день начала испытаний.

Животные. В работе использовались животные разводки ФГУП «Питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленобласть, Всеволожский район, Рапполово): мыши (*Mus musculus*) BALB/c и беспородные белые, массой 17-20 г, 6-8 недельные самцы; крысы (*Rattus*) белые, беспородные самцы с массой тела 200-250 г; морские свинки (*Cavia porcellus*), 5-6 недельные, весом 250-350 г. Куры (*Gallus domesticus*), породы White Leghorn, 5 и 6 недельные, свободные от патогенов (Specific pathogen free, SPF), разводки Северо-Восточной

исследовательской птицеводческой лаборатории, Джорджия, США. Хорьки (*Mustela putorius furo*), 6-12 недельные самки, проверенные на отсутствие антител к циркулирующим вирусам гриппа, разводки фермы Triple-F, Sayre, Пенсильвания, США.

4.4.1 ОЦЕНКА БЕЗВРЕДНОСТИ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Определение острой токсичности вакцинного штамма и ЖГВ предполагает однократное введение препарата двум видам животных: белым беспородным мышам и морским свинкам.

Белые мыши. Аллантаисный вакцинный вирус в объеме 0,5 мл вводили внутривентрально (в/бр) в дозе не менее 8,7 – 9,2 lg ЭИД₅₀/мл на животное. Контрольным животным вводили стерильный фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объеме. Исследовали 10 животных на группу. Физиологическое состояние животных оценивали в течение 21 дня при ежедневном осмотре.

Морские свинки. Аллантаисный вакцинный вирус вводили однократно подкожно (п/к) в объеме 5 мл, в дозе 8,7 - 10.2 lg ЭИД₅₀/мл на животное. Контрольным животным вводили стерильный фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объеме. Экспериментальная группа состояла из 20 животных. Выживаемость морских свинок оценивали при ежедневном осмотре в течение 2 недель.

Наблюдение за животными осуществляли ежедневно, с регистрацией всех изменений в состоянии здоровья каждого животного. В день окончания наблюдений каждое животное взвешивали. Контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Испытуемый препарат считали нетоксичным, если: все животные оставались живыми в течение периода наблюдений; ни у одного животного не выявлялись признаки заболевания; масса каждого животного в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с исходной. Помимо этого, ни у одной морской свинки, получившей препарат подкожно, в месте введения не должен развиваться некроз или абсцесс.

Если в течение периода наблюдений регистрируется гибель, заболевание, уменьшение массы, развитие некроза или абсцесса хотя бы у одного животного, испытание должно быть повторено на удвоенном количестве животных того же вида. Повторное испытание считают удовлетворительным, если его результат отвечает всем перечисленным требованиям.

Определение подострой токсичности вакцинного штамма и ЖГВ проводили при введении два дня подряд интраназально (и/н) мышам (по 0,05 мл в каждый носовой ход) или морским свинкам (по 0,2 мл в каждый носовой ход) неразведенных аллантаисных культур вируса, содержащих не менее 8,7-9,2 lg ЭИД₅₀/мл. Контрольным животным вводили стерильный фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объеме. Ежедневно в течение всего

физиологического исследования проводился контроль общего состояния каждого животного. Под токсичностью вируса гриппа подразумевается способность неадаптированных к животным штаммов вызывать у них развитие геморрагического отека легких при отсутствии видимой репродукции вируса [32]. Штамм считали токсичным, если в течение первых 3-4 дней после заражения наступала гибель 60-100% подопытных животных.

Оценка безвредности вакцинных штаммов на хорьках. Хорьки обладают наиболее высокой восприимчивостью к заражению вирулентными штаммами вирусов гриппа, поэтому в ограниченном числе опытов для изучения аттенуированного фенотипа штаммов ЖГВ на основе пандемических, либо обладающих пандемическим потенциалом вирусов гриппа, исследования проводили на хорьках. Животных (по 6 хорьков на каждый вирус) заражали по 0,5 мл интраназально в дозе 6,0 или 7,0 lg ЭИД₅₀/на животное исследуемыми вирусами. Перед заражением, для внутримышечной анестезии, использовали следующую смесь: Ketamine HCl (Ketaset) – 0,3 мл, Xylazine (Rompun) – 0,3 мл, Atropine Sulfate – 0,2 мл. На третий день после заражения животных умерщвляли, вводя в сердце 3,0 мл Beuthanasia-D, и извлекали органы респираторного тракта (легкие и носовые ходы) для определения в них концентрации инфекционного вируса путем титрования вирусосодержащих суспензий в РКЭ. Титр вируса выражали в lg ЭИД₅₀/мл/г.

Оценка безвредности вакцинных штаммов на курах. Оценку безопасности вакцинных штаммов на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц на 6-недельных SPF-курах проводили в совместных исследованиях с др. David Swayne (Southeast Poultry Research Laboratory, Athens, GA, USA). Целью исследования является (1) изучение вакцинных вирусов в стандартном тесте патогенности при в/в введении препарата и (2) изучение распространения вакцинного вируса в органах и тканях при и/н введении препарата (тест на стандартное и/н инфекционное заражение)

(1) В стандартном тесте патогенности: десять кур заражали в/в 10-кратными разведениями вирусосодержащей (7,0-7,5 lg ЭИД₅₀/мл) аллантоисной жидкости в объеме 0,1 мл на птицу. Для заражения использовали H5-ЖГВ или родительские вирусы согласно протоколу IVPI (индекс внутривенной патогенности) [288]. Наблюдение велось в течение 10 дней, с интервалом в 24 часа. Индекс внутривенной патогенности – это средний балл при наблюдении за птицами в течение 10-дневного периода. Индекс 3,00 означает, что все птицы погибли в течение 24 часов, индекс 0,00 означает, что ни одна птица не показала развития каких-либо клинических признаков в течение 10-дневного периода наблюдения.

(2) При исследовании распространения вакцинного вируса в органах и тканях десять кур и/н заражали дозой на птицу 6 lg ЭИД₅₀/0,1 мл. На 3-й день у двух умерщвленных птиц собирали образцы мазков из глотки, клоаки, ткани легких, почек, сердца и головного мозга.

Проводили гистопатологическое исследование тканей. Образцы мазков или разбавленные в десять раз образцы тканей высевали для обнаружения вирусной репродукции в РКЭ в 0,2 мл (по 3 10-дневных РКЭ на образец). Остальных кур использовали для исследования иммуногенности вакцинных штаммов.

4.4.2 ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ IN VIVO

Специфические гипериммунные крысиные сыворотки получали 4-х кратной, с интервалом в 2-3 дня, внутривентральной иммунизацией неразведенной вирусосодержащей аллантоисной жидкостью в объеме 5,0 мл. Через две недели после первой иммунизации животных умерщвляли посредством эфирного наркоза и обескровливали пункцией сердца.

Для разрушения неспецифических ингибиторов проводили обработку гипериммунных сывороток препаратом RDE (receptor destroying enzyme) производства «Denka Seiken Co, LTD» (Токио, Япония) согласно протоколу производителя.

Исследование антител сыворотки крови проводили в РТГА по стандартной методике с 1% эритроцитами кур или человека 0(I) Rh+.

Конечный рабочий титр сыворотки к донору аттенуации, используемой для селективных пассажей и клонирования составлял 1:50–1:80 ГАЕ.

Специфические гипериммунные кроличьи сыворотки получали 3-кратной иммунизацией взрослых беспородных 6-недельных SPF кроликов, самок, породы новозеландский белый. Вводили подкожно по 1,0 мл вируса с интервалом в 21 день. Вирус для иммунизации инактивировали 0,025% бета-пропиолактоном, концентрировали и очищали в градиенте плотности сахарозы.

Изучение иммуногенности вакцинных штаммов на курах (совместные исследования с др. David Swayne). 5-недельным SPF-курам вводили вакцину интраназально (и/н) в дозе 6 lg ЭИД₅₀/0,1 мл. В течение 10 суток проводили наблюдение за развитием признаков инфекции (респираторная инфекция, слабость, диарея, цианоз в области инокуляции, отек головы, неврологические симптомы). Образцы крови брали на 14 день после интраназального введения вакцины.

Изучение иммуногенности вакцинных штаммов на хорьках проводилось в совместных исследованиях в университете Питтсбурга (США), в ViroClinics Biosciences, и отделе вирусологии Медицинского центра Erasmus в Роттердаме (Голландия). Группы животных (6 особей на группу) двукратно, с интервалом 28 дней, и/н иммунизировали дозой 7 lg ЭИД₅₀ в объеме 0,5 мл. Образцы крови собирали под анестезией через 4 и 6 недель после иммунизации. Сыворотки исследовали в РТГА с гомологичными и гетерологичными вирусными антигенами.

Защита хорьков, иммунизированных вакцинным штаммом, от инфекции «диким» вирусом. Через 2 недели после 2-кратной иммунизации животные были инфицированы вирусом дикого типа (6 Ig БОЕ в объеме 0,5 мл). Изучали приживляемость дикого вируса в носовых ходах и легких хорьков у животных, предварительно иммунизированных вакцинным штаммом (6 хорьков) или получивших препарат плацебо (6 хорьков). В течение 14 дней хорьки ежедневно обследовались на признаки потери веса, заболевания или смертность, как описано в [243]. У них ежедневно исследовались носовые смывы. Трех животных из каждой группы умерщвляли на 3-й день после инфекции, оставшихся - через 14 дней. Образцы легких и носовых ходов гомогенизировали и разводили средой DMEM до конечной концентрации 100 мг/мл. Определяли титры БОЕ вируса в легких, носовых ходах и назальных смывах.

4.5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение РНК из аллантоисной жидкости осуществляли с помощью QIAamp Viral RNA Minikit в соответствии с протоколом производителя (Qiagen GmbH, Германия).

Подготовку кДНК осуществляли с помощью Quantitect Reverse Transcription Kit в соответствии с протоколом производителя (Qiagen GmbH, Германия). Для этого использовали универсальные праймеры, позволяющие в одной реакции синтезировать кДНК для всех фрагментов генома вируса гриппа. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Последовательность универсального прямого праймера для вирусов гриппа типа А: 5'TCGACGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGG) (Invitrogen, Cat. No 188).

Последовательность универсального прямого праймера для вирусов гриппа типа В: 5'ACGTTGCAAGCAGAAGC (Invitrogen, Cat. No 082).

Программа для получения кДНК: 42°C – 15 минут, 95°C – 3 минуты.

Подбор праймеров для скрининга реассортантных штаммов вирусов гриппа А и В. Для подбора праймеров с помощью программы «Clone Manager 9» осуществляли выравнивание нуклеотидных последовательностей эпидемических вирусов гриппа А и В с сиквенсом соответствующего донора аттенуации. Сиквенсы «диких» вирусов гриппа получены из Баз данных [7, 8].

4.5.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ФОРМУЛЫ ГЕНОМА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ RFLP-АНАЛИЗА (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АВТОРСКИЙ МЕТОД)

Подбор программ и праймеров для скрининга реассортантных штаммов вирусов гриппа.

Пары праймеров для RFLP-анализа генов сконструированы на основе сравнения нуклеотидных

последовательностей современных штаммов вируса гриппа А (H1N1), А (H3N2), В и доноров аттенуации А17, В60. Подобранные праймеры и эндонуклеазы рестрикции представлены в таблицах В.1 и В.2 приложения.

ПЦР-программа. Для амплификации ДНК-фрагментов генома со специфичными праймерами была использована следующая программа: 94°C – 4 минуты; 45 циклов {94°C – 1 минута, 50°C – 2 минуты, 72°C – 1 минута}, затем 72°C – 10 минут.

Амплификацию ДНК-фрагментов генома проводили в ДНК-амплификаторе Eppendorf Master Cycler® gradient.

Необходимые реагенты и рестриктазы получали в компании «СибЭнзим» (Новосибирск).

В амплифицируемых с помощью подобранных праймеров фрагментах ДНК «диких» вирусов имеются сайты рестрикции для определенных ферментов, тогда как в соответствующих участках генов донора аттенуации эти сайты рестрикции отсутствуют (или наоборот). Время расщепления амплификата ферментом, температура реакционной смеси и условия инкубации подобраны в соответствии с протоколом фирмы-производителя ферментов.

Продукты гидролитического расщепления амплифицированных фрагментов ДНК анализировали с помощью гель-электрофореза в 1,7% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидиума бромида, с последующей регистрацией результатов на трансиллюминаторе ЕСХ (Vilber Lourmat) в ультрафиолетовом свете при длине волны УФ 330 нм.

4.5.2 ХАРАКТЕРИСТИКА СОХРАННОСТИ МУТАЦИЙ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ, У РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А С ПОМОЩЬЮ RFLP АНАЛИЗА

Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для анализа сохранности уникальных мутаций, специфичных для донора аттенуации А17 представлен в таблице В.9 приложения [цитируется по 320]. RFLP-анализ проводили, как описано в разделе 4.4.1.

4.5.3 ХАРАКТЕРИСТИКА ФОРМУЛЫ ГЕНОМА РАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКС (ДА-НЕТ)-РСР АНАЛИЗА (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АВТОРСКИЙ МЕТОД)

Подбор программ и праймеров для скрининга реассортантных штаммов вирусов гриппа А и В. ПЦР-программы и вирус-специфические праймеры конструировали таким образом, чтобы с конкретной парой праймеров получить ПЦР-продукт только для гена «дикого» вируса (праймеры, специфичные для «дикого» вируса), либо для донора аттенуации (праймеры,

специфичные для донора аттенуации). Более того, праймеры конструировались таким образом, чтобы ПЦР–продукты соответствующих генов родительских вирусов отличались по размеру.

Двенадцать ПЦР-программ, использованных для генотипирования реассортантных вирусов и отбора 6:2 вакцинных штаммов, представлены в табл. В.3 приложения. Праймеры, подобранные для анализа состава генома вирусов гриппа А (H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H1N1 pdm09) и В в сравнении с донорами аттенуации А17, В60/525, или А/PR/8/34 (для реассортантов на основе вирусов гриппа птиц А(H5N1) представлены в таблицах В.4 – В.8 приложения.

ПЦР и электрофорез. Амплификацию проводили в ДНК–амплификаторе Eppendorf Master Cycler. Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1,7% агарозном геле, окрашенном этидиумом бромидом (0,5 мкг/мл). Продукты амплификации визуализировали на трансиллюминаторе ЕСХ (Vilber Lourmat) при длине волны УФ 330 нм.

Необходимые реагенты получали в компании «СибЭнзим» (Новосибирск).

4.5.4 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ СЕГМЕНТОВ ГЕНОМА

Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли при использовании автоматического капиллярного ДНК-секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Подбор праймеров, сравнение аминокислотных последовательностей и последующая обработка данных производилось с использованием пакета программ «Lasergene 7.1» (DNASTar).

Обратную транскрипцию с ПЦР фрагментов генома вирусов гриппа А и В осуществляли с использованием набора реагентов OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Германия) и универсальных праймеров [276, 277] в соответствии с протоколом производителя.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей эпидемических вирусов гриппа А и В с сиквенсом доноров аттенуации А17 и В60 осуществляли с помощью программы «Clone Manager 9». Сиквенсы «диких» вирусов гриппа получали из Баз данных [7, 8].

Компьютерное моделирование пространственной структуры молекул белков проводилось с использованием сервера SWISS-MODEL [518], компьютерной программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0. и сервера ZDOCK [611]. За основу принимались структуры вирусов из базы данных Protein Data Bank (www.rcsb.org) с минимальными отличиями в аминокислотной последовательности. Визуализация полученной структуры и картирование расположения мутаций производилась с использованием компьютерных программ RasMol 2.7.5, PyMol 1.3.

4.6 ИЗОЛЯЦИЯ ВАКЦИННЫХ ВИРУСОВ ОТ ПРИВИТЫХ ЛИЦ ПРИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА ОГРАНИЧЕННЫХ КОНТИНГЕНТАХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

Выделение вирусов из носовых ходов лиц, привитых гриппозной аллантоисной живой интраназальной вакциной, выпускаемой Иркутским ФГУП по производству иммунобиологических препаратов НПО «Микроген», проводили в различных испытаниях с 1 по 7 день после вакцинации. Собранным материалом мазков заражали РКЭ, которые инкубировали при 32-33°C в течение 48-72 часов. Наличие вируса в аллантоисной жидкости устанавливали в РГА. При отрицательном результате РГА проводили два дополнительных пассажа исследуемого материала в РКЭ. Выделенные вирусы проверяли в РТГА на соответствие гемагглютиниона прививаемому вакцинному штамму, проводили фенотипическое подтверждение *ts/ca* фенотипа и проводили полное секвенирование генома для определения сохранности аттенуирующих мутаций и регистрации возможного появления новых мутаций.

4.7 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Достоверность результатов исследований оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых переменных и критерия χ^2 [82]. Для обработки данных использовали программы «MS Office Excel», «Statistica 6.0» и «SPSS». Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 5 РОЛЬ ГЕНОВ В АТТЕНУАЦИИ ВИРУСА ГРИППА

Ранее было продемонстрировано, что популяция донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (A17) гетерогенна и состоит из клонов, отличающихся между собой набором мутаций во внутренних генах, сохранивших при этом выраженный *ts/ca/att* фенотип неклонированного вируса [48, 319]. Неоднородность популяции донора аттенуации A17 объясняется тем, что он был получен в результате последовательных пассажей родительского вируса при пониженной температуре 25°C без этапов клонирования, и задача получения чистого клона авторами ранее не ставилась. В настоящее время для получения реассортантов ЖГВ используется чистый клон донора A17, обладающий оптимальными для донора аттенуации характеристиками. Достаточно полно изучена роль отдельных мутантных генов донора A17 в проявлении его *ts* фенотипа и связанной с ним аттенуации [55, 289, 323].

Однако требовало подтверждения сохранения стабильности *ts*-признака, сопряженного с мутантными генами донора A17, когда они находятся в окружении генов эволюционно удаленных современных эпидемических вирусов. К проведенным ранее исследованиям такого плана [37] необходимо было применение более системного подхода.

Донор аттенуации В/СССР/60/69 (B60) был подготовлен с использованием такого же методического подхода, что и A17. Можно было ожидать, что и он представляет собой гетерогенную популяцию, состоящую из клонов, различающихся между собой по набору мутаций. Однако таких исследований до настоящего времени не проводилось, что не давало возможности характеризовать донор B60 на молекулярном уровне.

Все вышесказанное определяет актуальность представленных ниже результатов исследования.

5.1 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А/ЛЕНИНГРАД/134/17/57 (H2N2) В ФОРМИРОВАНИИ *ts* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А

Поскольку установлено, что признак аттенуации напрямую сопряжен с температурочувствительным, но не с холодаадаптированным фенотипом [297, 323], мы сосредоточили внимание именно на *ts* характеристике реассортантных штаммов.

На первом этапе исследований была получена коллекция из 38 реассортантов, обладающих разными наборами генов от эпидемического родителя и чистой линии донора аттенуации A17. В качестве эпидемического родителя был выбран вирус А/Новая

Каледония/20/99(H1N1), как модельный вирус, обладающий высокой устойчивостью репродукции при температурах выше оптимальных. «Дикий» *non-ts* вирус А/Новая Каледония/20/99 скрещивали в РКЭ с *ts* донором аттенуации. Для получения максимального разнообразия составов генома реассортантных штаммов, в ряде случаев использовали промежуточные скрещивания уже имеющихся реассортантов с донором А17 или эпидемическим вирусом А/Новая Каледония/20/99 (H1N1).

Было показано, что не только вакцинные реассортанты, у которых все 6 внутренних генов «дикого» родителя замещены на гены донора аттенуации (формула генома 6:2), проявляли *ts* фенотип (табл. 5.1). Замена всех генов внутренних белков, за исключением гена РА или М, на гены донора (5:3 реассортанты) также сопровождалась приобретением *ts* фенотипа, доказывая отсутствие видимого влияния генов РА и М на проявление исследуемого признака. Реассортанты с формулой генома 4:4, у которых в число внутренних генов от донора включены все три полимеразных гена РВ2, РВ1, РА и дополнительно ген М или NS также демонстрировали высокую чувствительность к повышению температуры инкубации, характерную для донора аттенуации. Напротив, реассортанты, унаследовавшие от донора аттенуации ген РВ2 или М (1:7 реассортанты), либо эти гены в паре друг с другом (2:6 реассортанты), не проявляли температурочувствительного фенотипа. Также *non-ts* фенотипом характеризовались 2:6 реассортанты с генами донора РВ1+М. Другие реассортанты (3:5), имеющие в своем составе гены РВ1+NP+М, или РВ1+РА+М, а также РВ1+РА+NS от донора аттенуации также оказались *non-ts*, как и их «дикий родитель». Включение же в состав генома набора из трех генов донора РВ2+РВ1+РА, или РВ2+РВ1+NP, как и в случае комплексов РВ2+РВ1+М, РВ2+РА+М, приводило к проявлению *ts* фенотипа. Это при том, что присутствие мутантных генов РВ2+М и РВ1+М в составе 2:6 реассортантов не меняло *non-ts* фенотип «дикого» родителя.

Представленные результаты указывают на то, что температуроустойчивый фенотип эпидемического вируса менялся на температурочувствительный у всех исследованных реассортантов, обладавших генами РВ2+РВ1, кодирующими белки полимеразного комплекса, от донора аттенуации А17. Эти исследования подтверждают установленную ранее роль мутантных генов донора аттенуации в проявлении *ts* фенотипа самого донора [323]. Кроме того, дополнительно продемонстрировано, что комбинация генов донора РВ2+РА в составе 3:5 реассортантов РВ2+РА+М, также приводила к манифестации признака температурочувствительности.

Таким образом, залогом формирования *ts* фенотипа реассортантов вируса А/Новая Каледония/20/99 с донором аттенуации стало замещение в составе генома «дикого»

Таблица 5.1 - Роль мутантных генов в формировании температурочувствительного фенотипа реассортантов донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и «дикого» вируса А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)

Количество реассортантов	Ген						RCT ₄₀ (ЭИД ₅₀ /мл)	Фенотип
	PB2	PB1	PA	NP	M	NS		
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ОДИН ГЕН (1 : 7)								
1	17 ¹	wt ²	wt	wt	wt	wt	3,0±0,2	<i>non-ts</i>
1	wt	wt	wt	wt	17	wt	3,2±0,1	<i>non-ts</i>
1	wt	wt	wt	17	wt	wt	3,0±0,2	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ДВА ГЕНА (2 : 6)								
2	17	wt	wt	wt	17	wt	3,0±0,2 ³	<i>non-ts</i>
6	wt	17	wt	wt	17	wt	2,7±0,3 ³	<i>non-ts</i>
1	wt	17	wt	wt	wt	17	3,1±0,0	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ТРИ ГЕНА (3 : 5)								
5	17	17	17	wt	wt	wt	6,4±0,3 ³	<i>ts</i>
1	17	wt	17	wt	17	wt	5,7±0,4	<i>ts</i>
1	wt	17	wt	17	17	wt	3,0±0,2	<i>non-ts</i>
1	wt	17	17	wt	17	wt	2,7±0,2	<i>non-ts</i>
3	17	17	wt	wt	17	wt	6,0±0,1 ³	<i>ts</i>
1	17	17	wt	17	wt	wt	5,8±0,2	<i>ts</i>
1	wt	17	17	wt	wt	17	3,0±0,1	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ЧЕТЫРЕ ГЕНА (4 : 4)								
3	17	17	17	wt	17	wt	5,9±0,3 ³	<i>ts</i>
2	17	17	17	wt	wt	17	6,2±0,2 ³	<i>ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ПЯТЬ ГЕНОВ (5 : 3)								
1	17	17	17	wt	17	17	6,4±0,4	<i>ts</i>
2	17	17	17	17	17	wt	6,2±0,3 ³	<i>ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ С ВАКЦИННОЙ ФОРМУЛОЙ ГЕНОМА (6 : 2)								
8	17	17	17	17	17	17	6,0±0,2 ³	<i>ts</i>
РОДИТЕЛЬСКИЕ ВИРУСЫ								
А17, донор <i>att</i>	17	17	17	17	17	17	6,2±0,3	<i>ts</i>
wt вирус	wt	wt	wt	wt	wt	wt	3,0±0,2	<i>non-ts</i>

Здесь и в табл.5.2: ¹ген принадлежит донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (А17);
²ген принадлежит «дикому» (wt) вирусу гриппа. ³Среднее значение на группу.

родительского вируса, как минимум, двух полимеразных генов на гены донора: либо PB2+PB1, либо PB2+PA. Участие мутантного гена PB2 было обязательным, но недостаточным для проявления признака температурочувствительности.

На втором этапе работы (табл. 5.2) была поставлена задача подтвердить универсальность роли генов полимеразного комплекса в проявлении *ts* фенотипа, продемонстрированную выше на модели одной пары вирусов.

Была создана представительная коллекция из 187 реассортантных вирусов от скрещивания донора A17 с 12 различными эталонными вирусами гриппа А (H1N1) и А (H3N2), обладающими высокой устойчивостью репродукции в РКЭ за верхними пределами температурного оптимума. Представленные в таблице 5.2 данные свидетельствуют о том, что все реассортанты с формулой генома 6:2, 5:3, 4:4, 3:5 и 2:6, унаследовавшие от донора полимеразный ген PB2 совместно с геном PB1 либо с геном PA, проявляли *ts* фенотип. Включение в состав генома реассортантного вируса какого-то одного полимеразного гена или комбинации генов PB1+PA от донора оказалось недостаточным для формирования температурочувствительности.

Таким образом, анализ *ts* фенотипа реассортантов между донором аттенуации A17 (H2N2) и эпидемическими вирусами гриппа А (H1N1) и А (H3N2), выделенными в различные годы, показал обязательное, однако недостаточное участие белка PB2 донора в проявлении признака температурочувствительности. Детальная характеристика комбинаций «диких» генов с мутантными генами донора аттенуации A17, как на примере одного эпидемического вируса, так и различных современных вирусов подтверждает, что не только установленная ранее конstellляция мутантных белков полимеразного комплекса донора PB2+PB1, но и мутантные белки в сочетании PB2+PA, способны обуславливать температурочувствительный фенотип в РКЭ реассортантов вируса гриппа А.

5.2 ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЧИСТОЙ ЛИНИИ

ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69

5.2.1 ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕТЕРОГЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ

ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69

В настоящем разделе работы приведены результаты изучения состава популяции донора аттенуации В/СССР/60/69. Донор аттенуации В60 двукратно клонировали методом предельных разведений в РКЭ при оптимальной температуре инкубации 32°C. Выделенные из популяции донора 18 клонов были исследованы на способность к репродукции при различных температурах инкубации. Стандартный метод характеристики *ts* фенотипа вирусов гриппа В

Таблица 5.2 - Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа А
и их *ts* фенотипом

Количество *реассортантов	Ген								Фенотип реассортантов
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ДВА ГЕНА (2 : 6)									
4	17	wt	wt	wt	wt	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
6	wt	17	wt	wt	wt	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
3	17	17	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
1	17	wt	17	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
4	wt	17	17	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>
2	wt	17	wt	wt	wt	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
3	wt	wt	17	wt	wt	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
2	wt	wt	17	wt	wt	wt	wt	17	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ТРИ ГЕНА (3 : 5)									
3	17	17	17	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
2	17	wt	17	wt	17	wt	wt	wt	<i>ts</i>
4	17	wt	17	wt	wt	wt	17	wt	<i>ts</i>
5	wt	17	17	wt	wt	wt	wt	17	<i>non-ts</i>
3	wt	17	wt	wt	17	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
2	wt	wt	17	wt	wt	wt	17	17	<i>non-ts</i>
1	wt	wt	wt	wt	17	wt	17	17	<i>non-ts</i>
5	17	17	17	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
2	17	17	wt	wt	wt	wt	17	wt	<i>ts</i>
3	17	17	wt	wt	wt	wt	wt	17	<i>ts</i>
3	wt	17	17	wt	wt	wt	wt	17	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ЧЕТЫРЕ ГЕНА (4 : 4)									
2	17	17	17	wt	wt	wt	17	wt	<i>ts</i>
9	17	17	17	wt	wt	wt	wt	17	<i>ts</i>
1	17	17	17	wt	wt	wt	17	wt	<i>ts</i>
3	17	17	wt	wt	wt	wt	17	17	<i>ts</i>
1	17	wt	17	wt	17	wt	17	wt	<i>ts</i>
1	wt	17	17	wt	17	wt	17	wt	<i>non-ts</i>
2	17	wt	17	wt	wt	wt	17	17	<i>ts</i>
1	wt	17	17	wt	wt	wt	17	17	<i>non-ts</i>
1	wt	17	wt	wt	17	wt	17	17	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 ПЯТЬ ГЕНОВ (5 : 3)									
2	17	17	wt	wt	17	wt	17	17	<i>ts</i>
3	17	17	17	wt	wt	wt	17	17	<i>ts</i>
21	17	17	17	wt	17	wt	wt	17	<i>ts</i>
15	17	17	17	wt	17	wt	17	wt	<i>ts</i>
КАНДИДАТЫ В ВАКЦИННЫЕ ШТАММЫ: ШЕСТЬ ГЕНОВ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А17 (6 : 2)									
67	17	17	17	wt	17	wt	17	17	<i>ts</i>
Родительские вирусы									
А17, донор <i>att</i>	17	17	17	17	17	17	17	17	<i>ts</i>
12 wt вирусов	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>

*Реассортанты получены при скрещивании донора аттенуации А17 с эпидемическими вирусами: А/Нанчанг/933/95 (H3N2), А/Сидней/5/97 (H3N2), А/Перт/13/95 (H1N1), А/Иоганнесбург/82/96 (H1N1), А/Пекин/262/95 (H1N1), А/Панама/2007/99 (H3N2), А/Аичи/2/68 (H3N2), А/Соломоновы острова/03/06 (H1N1), А/Гонконг/2652/06 (H1N1), А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm, А/Виктория/361/2011 (H3N2), А/Индиана/10/2012(H3N2)v.

Таблица 5.3 - Репродукция донора аттенуации В/СССР/60/69 и его субклонов в развивающихся куриных эмбрионах при разных температурах инкубации

Вирус	Репродукция вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t°С				Фенотип при t°С		
	32°С	37°С	38°С	25°С	37°С	38°С	25°С
<i>Неклонированный донор В/СССР/60/69</i>							
В/СССР/60/69	9,2±1,2	3,5±2,8	1,2±0,9	7,4±1,1	<i>ts/±ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
<i>Первая группа клонов</i>							
В60/1	9,0±2,2	8,2±0,2	2,7±0,2	7,2±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/2	9,2±0,2	6,2±0,8	2,2±0,4	7,2±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/3	9,2±0,2	8,7±0,8	2,7±0,3	7,2±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/7	9,2±0,3	9,2±0,2	4,2±0,2	7,2±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/14	8,5±0,2	7,7±0,2	2,2±0,2	6,7±0,4	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/15	10,0±1,0	8,7±1,2	1,2±0,8	8,2±1,7	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/17	8,2±0,3	6,2±0,3	1,7±0,2	7,7±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/18	9,7±0,6	7,7±0,8	1,7±0,2	7,7±0,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/525	9,7±0,4	8,2±0,4	1,7±0,2	7,7±0,3	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
<i>Вторая группа клонов</i>							
В60/4	9,2±0,3	1,2±0,2	0,7±0,0	7,5±1,0	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/5	8,2±0,2	1,2±0,3	0,7±0,0	7,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/6	9,7±0,4	2,2±0,5	0,7±0,0	7,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/9	8,2±0,2	3,2±0,5	0,7±0,0	7,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/10	8,2±0,2	1,2±0,2	0,7±0,0	6,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/11	9,0±0,3	1,2±0,3	0,7±0,0	7,7±0,3	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/22	8,7±0,2	1,2±0,2	0,7±0,0	6,2±0,4	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/252	8,5±0,2	1,2±0,2	0,7±0,0	7,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В60/4222	8,5±0,2	2,2±0,2	0,7±0,0	7,7±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>

подразумевает оценку их способности к репродукции при повышенной до 38°С температуре (*ts/non-ts*38°). Результаты, представленные в таблице 5.3, демонстрируют, что все клоны, как и исходный неклонированный донор В60, обладали *ts* фенотипом при 38°С. Однако при снижении температуры инкубации всего на один градус – до 37°С, клоны по способности к репродукции четко распределились на две группы. Одна группа обладала низкой репродуктивностью при 37°С (клоны 4, 5, 6, 9, 10, 11, 22, 252, 4222), то есть *ts* фенотипом, а другие клоны проявляли температуроустойчивость при этой температуре инкубации – *non-ts* фенотип (клоны 1, 2, 3, 7, 14, 15, 17, 18, 525). Количественное соотношение исследованных клонов, обладающих *ts*37° и *non-ts*37° фенотипом, оказалось практически одинаковым. Неклонированный донор аттенуации В60 по своему отношению к температуре инкубации 37°С занял промежуточное положение между двумя выявленными группами. Средний титр его репродукции при 37°С по результатам разных экспериментов составил 3,5±2,8 lgЭИД₅₀/мл. Такой статистический разброс величины титра репродукции у неклонированного донора как раз и может быть объяснен проявлением влияния клонов, составляющих гетерогенную популяцию.

По способности к репродукции при пониженной температуре 25°C все исследованные клоны характеризовались *sa* фенотипом и не различались по этому признаку между собой и с неклонированным донором. Для дальнейшего сравнительной характеристики отобраны клоны В60/252 и В60/525. На рисунке 5.1, для наглядности в графической форме, представлены особенности репродукции представителей клонов из двух различающихся групп и гетерогенного

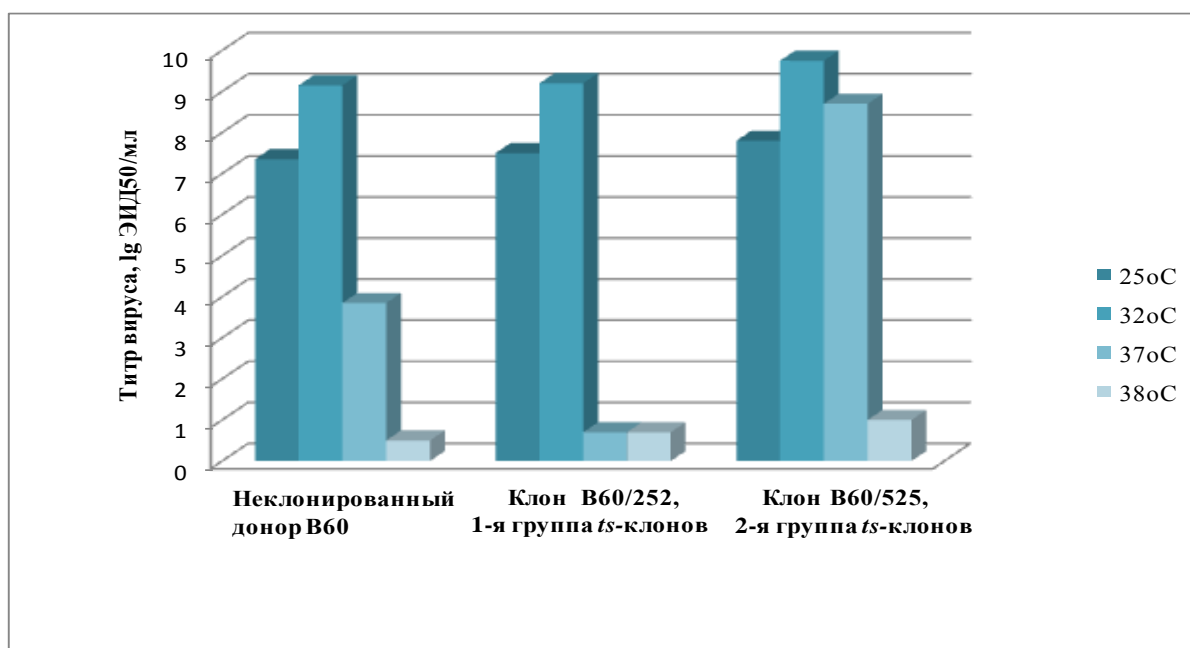


Рис. 5.1 - Фенотипические особенности донора аттенуации В/СССР/60/69 и клонов из его гетерогенной популяции

донора аттенуации В60 при разных температурах инкубации. При сходных характеристиках репродукции неклонированного донора и его клонов В60/252 и В60/525 при 38° и 25°C, подтверждающих их *ts*, *sa* фенотип, видны существенные различия между клонами в способности к репродукции при температуре 37°C.

5.2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛОНОВ ИЗ ГЕТЕРОГЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69

Были отобраны два клон из популяции донора: *ts*37° клон В60/252 и *non-ts*37° клон В60/525, которые затем были дополнительно двукратно клонированы *in ovo*, после чего было проведено полное секвенирование их геномов.

Результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа двух этих клонов показали, что они различаются лишь по одной аминокислотной замене Пе-644-Val в белке РВ1,

которая была выявлена у более температурочувствительного клона В60/252 (табл. 5.4) и отсутствует у клона В60/525. (Характеристика мутаций, специфичных для донора аттенуации представлена в подразделе 5.5.2). С высокой степенью вероятности можно полагать, что формирование более выраженной температурочувствительности у клона В60/252 связано с обнаруженной мутацией.

Таблица 5.4 - Различия в аминокислотной последовательности белка РВ1 клонов донора аттенуации В/СССР/60/69, отличающихся по температурочувствительности репродукции в куриных эмбрионах при 37°С

Белок РВ1	Аминокислотная позиция	Аминокислота соответствующего клона	
		В60/252, <i>ts37°</i>	В60/525, <i>non-ts37°</i>
	644	Le	Val

5.2.3 ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ КЛОНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60/252 И В60/525 В ОПЫТАХ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для оценки возможных различий в прививочных свойствах клонов из гетерогенной популяции донора В60, отличающихся по *ts37°* признаку, использовали морских свинок. Морские свинки являются высокочувствительной к вирусам гриппа адекватной и доступной моделью, позволяющей оценивать индуцированный вирусами постинфекционный гуморальный иммунный ответ [157, 448].

По 5 животных на группу иммунизировали вирусосодержащим материалом гетерогенного донора В60 и его клонов - В60/252 и В60/525 в титре 8,0 lg ЭИД₅₀/мл. Смывы, взятые на третий день после иммунизации, титровали в РКЭ. Вне зависимости от использованного варианта донора В60, вирус прижился у 100% подопытных животных (таблица 5.5). Титры вируса в носовых смывах колебались от 1,0 до 2,2 lg ЭИД₅₀/мл. В пересчете на группу выявилось, что клон В60/252 выделялся из носовых смывов несколько хуже, чем неклонированный донор аттенуации или клон В60/525 (1,2 lg ЭИД₅₀/мл против 1.8 и 1.6 lg ЭИД₅₀/мл соответственно).

Через 3 недели после заражения у всех свинок была взята кровь из сердца (по 1.0 мл) для оценки гуморального иммунного ответа к клонам донора аттенуации В60. Определение титра сывороточных антител в РТГА с эритроцитами различной видовой принадлежности (эритроциты курицы, морской свинки и человека) позволило наиболее специфично охарактеризовать иммунный ответ. Наилучший эффект иммунизации был продемонстрирован при использовании в РТГА эритроцитов человека, куриные эритроциты оказались значительно менее чувствительными, еще меньшей чувствительностью обладали эритроциты морской

свинки (рис. 5.2). Наиболее высокий гуморальный ответ наблюдался при интраназальном введении экспериментальным животным клона В60/525 (титр сывороточных антител 1:1000). Клон В60/252 показал более низкую иммуногенность (титр сывороточных антител 1:400), и это коррелировало с его более низкой приживляемостью в носовых ходах. Неклонированный донор по иммуногенности занял промежуточное положение между двумя клонами. Сопоставляя результаты изучения биологических свойств исследованных образцов донора В60, можно предположить, что клон В60/252, обладающий более выраженной температурочувствительностью по сравнению с клоном В60/525, оказался гиператтенуированным, что проявилось в снижении его иммуногенности для морских свинок.

Таблица 5.5 - Определение в РКЭ инфекционного титра донора аттенуации В/СССР/60/69 и его клонов в носовых смывах иммунизированных морских свинок

Вариант донора <i>att</i> В60	Свинка №	Титр, Ig ЭИД ₅₀ /мл	
		Индивидуальный	Средний на группу
В60, неклонированный	1	2.0	1,8±0,4
	2	1.7	
	3	2,0	
	4	1,7	
	5	1,8	
Клон В60/252	6	1.2	1,2±0,0
	7	1,0	
	8	1,4	
	9	1,2	
	10	1,2	
Клон В60/525	11	1,2	1,6±0,2
	12	1,5	
	13	1,4	
	14	1,7	
	15	2,2	

Вероятно, отмеченная гиператтенуация клона В60/252, в связке с его более выраженной температурочувствительностью, обусловлена дополнительной мутацией Pe-644-Val в гене, кодирующем субъединицу РВ1 РНК-зависимой-РНК-полимеразы.

Представленные результаты не только свидетельствуют о гетерогенности популяции донорского штамма В/СССР/60/69, но и о том, что использование неклонированного донора может привести к получению вакцинных штаммов со сниженной иммуногенностью. Таким образом, по генетическим, биологическим характеристикам, по результатам изучения репродуктивности и иммуногенности был отобран клон В/СССР/60/69/525.

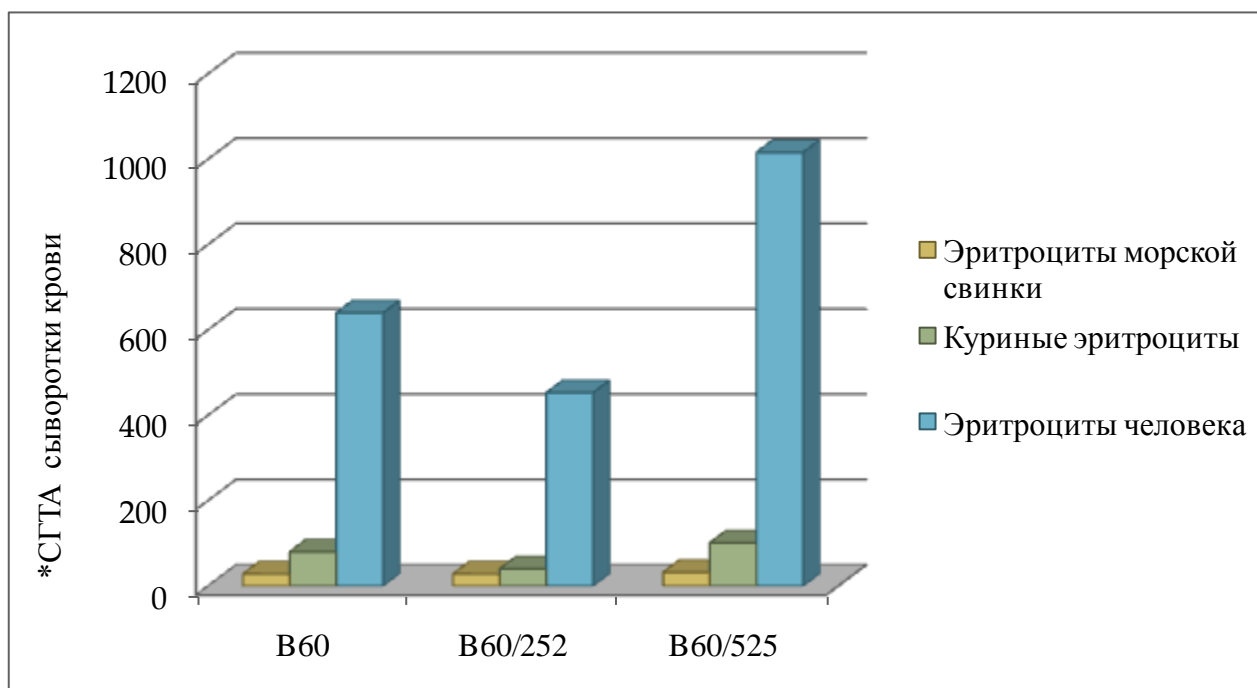


Рис. 5.2 - Гуморальный иммунный ответ морских свинок на интраназальное введение неклонированного донора В/СССР/60/69 и двух его клонов через 3 недели после заражения.
*Средний геометрический титр антител.

Во всех дальнейших исследованиях и в создании вакцинных реассортантов с 2001 года в нашей работе использовался исключительно клонированный донор аттенуации В60/525.

5.3 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69/525 В ФОРМИРОВАНИИ *ts* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА В

По аналогии с подготовкой реассортантов на основе эпидемических вирусов гриппа А (см. раздел 7.1), эпидемические *non-ts* (38°C) вирусы гриппа В скрещивали с *ts* донором аттенуации В60/525 с целью получить реассортанты с различным набором генов от «дикого» вируса и донора аттенуации. Получив репрезентативную коллекцию из 36 одногенных и полигенных реассортантов из скрещивания донора В60 с шестью эпидемическими вирусами, относящимся к эволюционным ветвям «Виктория» (В/Виктория/2/87, В/Шандонг/7/97, В/Архангельск/312/99, В/Гонконг/330/01) и «Ямагата» (В/Харбин /7/94, В/Яманаши/166/98), мы изучили температурочувствительность их репродукции.

Результаты исследования, представленные в таблице 5.6, свидетельствуют, что полимеразные гены PB2 и PA донора В60/525, включенные в состав генома реассортантов на основе эпидемических вирусов, как совместно, так и по отдельности определяют формирование *ts* фенотипа. Так, все реассортанты из группы 7:1, содержащие единственный ген PB2 (реассортанты № 1, 2, 3) или единственный ген PA (реассортанты № 7, 8, 9, 10, 11) от донора

аттенуации В60 оказались температурочувствительными. В любых комбинациях генов донора и «дикого» вируса присутствие либо единственного гена PB2 донора (реассортанты № 25, 26, 27), либо единственного гена донора PA (№ 20, 28), либо их пары (реассортанты № 25, 30-36) обеспечивало формирование температурочувствительного фенотипа. Никакой другой ген донора аттенуации и никакая другая комбинация генов не участвовала в манифестации признака температурочувствительности (реассортанты № 4-6, 12-19, 21-24). Для удобства анализа индивидуальные данные, представленные в таблице 5.6 по отдельным вирусам, обобщены в сводной таблице 5.7. Видно, что замена лишь одного гена – либо PB2 либо PA, принадлежащего вирусу «дикого» типа, на соответствующий ген донора аттенуации (1:7 реассортанты) приводила к формированию температурочувствительного фенотипа. Тогда как включение в состав генома эпидемических вирусов генов PB1, NP, M или NS от донора по одному (1:7 реассортанты) или PB1 в паре с NP, M или NS (2:6 реассортанты) не изменяло способность реассортантов к репродукции за верхними пределами температурного оптимума. Независимо от количества и комплекса генов, унаследованных от донора В60/525, всегда и у всех реассортантов (формулы генома 7:1, 2:6, 3:5, 4:4 и 6:2) разных *non-ts* «диких» вирусов обеих эволюционных ветвей «Ямагата» и «Виктория» для проявления *ts* фенотипа достаточно было присутствия в их составе либо гена PB2, либо гена PA. Исследование 1:7 и 2:6 реассортантов также показало, что ген, кодирующий белок полимеразного комплекса PB1 донора В60/525, не оказывает влияния на формирование чувствительности реассортантов к повышенной температуре инкубации 38°C.

Таким образом, приобретение *ts* фенотипа реассортантами вирусов гриппа В связано с обязательным наследованием одного из мутантных генов полимеразного комплекса PB2 или PA от донора В60/525.

5.4 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69/525 В ФОРМИРОВАНИИ *ts* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ ГРИППА В

Ранее на модели донора А/Ленинград/134/17/57 было показано, что аттенуация для лабораторных животных и человека сопряжена с приобретением вирусами гриппа свойства чувствительности к повышенным температурам инкубации (*ts* фенотип) (Глава 3). Поэтому основное внимание при изучении роли генов донора В60/525 в формировании аттенуированного фенотипа реассортантов было направлено на установку генов ответственных за температурочувствительность. Однако, поскольку приобретение донорами свойства чувствительности к повышенной температуре было сопряжено с адаптацией к пониженной температуре культивирования, и при этом холодоустойчивость, наряду с *ts* и *att* фенотипом, является маркером донора и реассортантов на его основе, для характеристики донора важно

определить гены и мутации, ответственные за становление *ca* фенотипа. Были изучены 35 реассортантов с разным набором генов от донора В60/525 и эпидемических вирусов. В течение последних 40 лет выделяется много температурочувствительных вирусов гриппа В, циркулируют также природно-холодоустойчивые вирусы (см. главу 6.1). В исследование отбирались эпидемические вирусы, обладающие *non-ca* фенотипом, независимо от их природной температурочувствительности. Результаты исследования, представленные в таблице 5.8, свидетельствуют, что реассортанты наследуют признак холодоустойчивости с приобретением от донора аттенуации гена РА. Так, все реассортанты с формулой генома 5:3, 4:4, 3:5, 2:6 и 7:1, имеющие в своем составе ген донора В60, кодирующий белок полимеразного комплекса РА, наследовали его *ca* фенотип. Включение в геном «диких» вирусов других генов донора не меняло их природную холодоустойчивость. Среди реассортантов с формулой генома 7:1, только наследующие ген РА от донора В60, обладали *ca* фенотипом. Холодоустойчивость реассортантов, унаследовавших ген РА от донора аттенуации, проявлялась независимо от температурочувствительности родительских эпидемических вирусов. Реассортанты групп 4:4 и 3:5 наследовали *ca* фенотип при включении мутантного гена РА донора в состав как природных *ts*, так и *non-ts* вирусов. И наоборот: реассортанты обладали *non-ca* фенотипом независимо от естественной способности или неспособности «дикого» родительского вируса к репродукции при повышенной температуре, если наследовали ген РА *non-ca* родителя (представители групп реассортантов 7:1, 2:6).

Таким образом, независимо от количества и комплекса генов, унаследованных от донора В60, всегда и у всех реассортантов (формулы генома 7:1, 2:6, 3:5, 4:4, 5:3 и 6:2) для проявления *ca* фенотипа достаточно было присутствия в их составе гена РА.

5.5 ИДЕНТИФИКАЦИЯ УНИКАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69/525

Для определения уникальных *ts/ca* мутаций в геноме донора аттенуации необходимо его сравнение с исходным эпидемическим вирусом, из которого он был получен. Однако, в отличие от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, «дикий» предшественник которого - А/Ленинград/134/57 (H2N2) - известен, информация о «диком» прародителе донора аттенуации В/СССР/60/69 не сохранилась. В настоящем разделе работы предпринята попытка поиска исходного вируса-предшественника донора аттенуации В60/525 и определения уникальных мутаций и аминокислотных замен, специфичных для *ts/ca/att* фенотипа донора.

Таблица 5.6 - Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и их *ts* фенотипом

<i>wt</i> родитель	Сегменты генома								фенотип
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ОДИН ГЕН (1 : 7)									
В/Харбин/7/94	60 ¹	<i>wt</i> ²	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Яманаши/166/98	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Гонконг/330/01	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Яманаши/166/98	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Харбин /7/94	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Харбин /7/94	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Гонконг /330/01	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Гонконг/330/01	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Харбин/7/94	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Харбин/7/94	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Шандонг/7/97	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Яманаши/166/98	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Яманаши/166/98	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Харбин /7/94	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ДВА ГЕНА (2 : 6)									
В/Гонконг/330/01	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ТРИ ГЕНА (3 : 5)									
В/Гонконг/330/01	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>ts</i>
В/Архангельск/312/99	60	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Архангельск/312/99	60	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>ts</i>
В/Гонконг/330/01	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ЧЕТЫРЕ ГЕНА (4 : 4)									
В/Виктория/2/87	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Гонконг/330/01	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
КАНДИДАТЫ В ВАКЦИННЫЕ ШТАММЫ: ШЕСТЬ ГЕНОВ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 (6 : 2)									
В/Харбин /7/94	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Шандонг /7/97	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Яманаши/166/98	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Гонконг/330/01	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Виктория/2/87	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
В/Архангельск/312/99	60	60	60	<i>wt</i>	60	<i>wt</i>	60	60	<i>ts</i>
РОДИТЕЛЬСКИЕ ВИРУСЫ									
В/СССР/60/69, донор <i>att</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	<i>ts</i>
В/Виктория/2/87	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Харбин /7/94 ⁴	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Шандонг/7/97 ³	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Яманаши/166/98 ⁴	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Архангельск/312/99 ³	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>
В/Гонконг/330/01 ³	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>non-ts</i>

¹Гены принадлежат донору аттенуации В/СССР/60/69/525. ²Гены принадлежат эпидемическому (*wt*) родительскому вирусу. ³Вирус линии «В/Виктория/2/87». ⁴Вирус линии «В/Ямагата/16/88».

Таблица 5.7 - Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и их *ts* фенотипом (сводная таблица)

Количество реассортантов	Конstellация генов реассортантов							Фенотип реассортантов	
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M		NS
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ОДИН ГЕН (1 : 7)									
3	60 ¹	wt ²	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
3	wt	60	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>
5	wt	wt	60	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>
6	wt	wt	wt	wt	60	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>
1	wt	wt	wt	wt	wt	wt	60	wt	<i>non-ts</i>
1	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	60	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ДВА ГЕНА (2 : 6)									
1	wt	wt	60	wt	wt	wt	wt	60	<i>ts</i>
2	wt	60	wt	wt	wt	wt	wt	60	<i>non-ts</i>
1	wt	60	wt	wt	wt	wt	60	wt	<i>non-ts</i>
1	wt	60	wt	wt	60	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ТРИ ГЕНА (3 : 5)									
1	60	wt	60	wt	wt	wt	wt	60	<i>ts</i>
2	60	60	wt	wt	60	wt	wt	wt	<i>ts</i>
1	wt	wt	60	wt	wt	wt	60	60	<i>ts</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ЧЕТЫРЕ ГЕНА (4 : 4)									
1	60	wt	wt	wt	60	wt	60	60	<i>ts</i>
1	60	wt	60	wt	wt	wt	60	60	<i>ts</i>
ВАКЦИННЫЕ РЕАССОРТАНТЫ: ШЕСТЬ ГЕНОВ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 (6 : 2)									
6	60	60	60	wt	60	wt	60	60	<i>ts</i>
РОДИТЕЛЬСКИЕ ВИРУСЫ									
В60, донор <i>att</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	<i>ts</i>
6 wt вирусов	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>

¹Ген принадлежит донору аттенуации В/СССР/60/69/525.

²Ген принадлежит «дикому» (wt) вирусу гриппа В (см. табл. 5.6).

5.5.1 ПОИСК ГИПОТЕТИЧЕСКОГО «ДИКОГО» РОДИТЕЛЯ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69

В попытке установить «дикий» вирус-предшественник и определить уникальные, специфичные для донора аттенуации В60 мутации было проведено секвенирование его предполагаемого эпидемического предшественника. Это вирус гриппа В/СССР/69 из коллекции ФГУН Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора (ГИСК). Несмотря на то, что вирус был выделен в 1969 году и имеет аналогичное донору название, его молекулярно-генетический анализ однозначно свидетельствует, что он не может являться прародителем донора В60 из-за

Таблица 5.8 - Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и *ca* фенотипом

Количество реассортантов	Конstellация генов реассортантов ¹						<i>ts</i> фенотип <i>wt</i> родителя	<i>ca</i> фенотип реассортанта
	PB2	PB1	PA	NP	M	NS		
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ОДИН ГЕН (1 : 7)								
2 1	60 ²	wt ³	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i> <i>ts</i>	<i>non-ca</i>
2 1	wt	60	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i> <i>ts</i>	<i>non-ca</i>
4 1	wt	wt	60	wt	wt	wt	<i>non-ts</i> <i>ts</i>	<i>ca</i> <i>non-ca</i>
1	wt	wt	wt	60	wt	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
1	wt	wt	wt	wt	60	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ДВА ГЕНА (2 : 6)								
1	wt	60	wt	60	wt	wt	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
2	wt	60	wt	wt	wt	60	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
1	wt	wt	60	wt	wt	60	<i>non-ts</i>	<i>ca</i>
2	wt	wt	wt	60	60	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
1	wt	wt	wt	wt	60	60	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
1	60	wt	wt	60	wt	wt	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ТРИ ГЕНА (3 : 5)								
2	60	60	wt	60	wt	wt	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
1	60	wt	60	wt	wt	60	<i>non-ts</i>	<i>ca</i>
1	wt	60	60	wt	wt	60	<i>ts</i>	<i>ca</i>
1	wt	wt	60	wt	60	60	<i>ts</i>	<i>ca</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ЧЕТЫРЕ ГЕНА (4 : 4)								
3	60	60	60	60	wt	wt	<i>ts</i>	<i>ca</i>
1	60	wt	60	wt	60	60	<i>non-ts</i>	<i>ca</i>
1	60	wt	wt	60	60	60	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
1	wt	60	wt	60	60	60	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
1	wt	60	60	60	wt	60	<i>ts</i>	<i>ca</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ПЯТЬ ГЕНОВ (5 : 3)								
1 1	60	60	60	60	60	wt	<i>non-ts</i>	<i>ca</i>
							<i>ts</i>	
1	60	60	wt	60	60	60	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
РЕАССОРТАНТЫ, УНАСЛЕДОВАВШИЕ ОТ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В60 ШЕСТЬ ГЕНОВ (6 : 2)								
8	60	60	60	60	60	60	<i>non-ts/ts</i>	<i>ca</i>
РОДИТЕЛЬСКИЕ ВИРУСЫ								
В/СССР/60/69, <i>att</i>	60	60	60	60	60	60	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В/Харбин /7/94	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
В/С-Петербург/92/95	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
В/Иоганнесбург/05/99	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
В/Шанхай/361/02	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
В/Джилин/20/03	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>
В/Малайзия/2506/04	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>non-ts</i> ₃₇	<i>non-ca</i>
В/Флорида/7/04	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i> ₃₇	<i>non-ca</i>
В/Техас/26/08	wt	wt	wt	wt	wt	wt	<i>ts</i> ₃₇	<i>non-ca</i>

¹Все реассортанты унаследовали НА и NA от эпидемического вируса. ²Ген принадлежит донору аттенуации В60/525. ³Ген принадлежит эпидемическому родительскому вирусу.

бия несоответствий в нуклеотидной и аминокислотной последовательностях практически во всех генах и белках (таблица 5.9).

Несмотря на неудачу с поиском родительского вируса, уникальную для анализа информацию удалось получить благодаря сохранившемуся в коллекции ГИСК вирусу В/СССР/17/69 - промежуточному варианту на пути от неизвестного «дикого» вируса к современному донору аттенуации. Этот вирус был подготовлен в результате 17 пассажей в РКЭ при оптимальной температуре 32°C исходного «дикого» родительского вируса и использовался в СССР в 70-х гг. в производстве живой гриппозной вакцины для взрослых [132]. Далее, с целью получения вакцинного штамма для детей, вирус В/СССР/17/69 для усиления аттенуирующих свойств был подвергнут 60-кратному пассированию в РКЭ при 25°C, и соответственно был назван В/СССР/60/69. Впоследствии он стал применяться в качестве донора аттенуации для живой гриппозной реассортантной вакцины [6, 135].

С высокой долей вероятности можно предполагать, что неизвестный общий предшественник вакцинного штамма В/СССР/17/69 и донора аттенуации В60 обладал *non-ts/non-ca* фенотипом, как и другие эпидемические вирусы гриппа В тех лет выделения (см. главу 6). В результате 17 пассажей в куриных эмбрионах вирус В/СССР/17/69 приобрел температурочувствительность (*ts* фенотип), однако, сохранил *non-ca* фенотип. Таким образом,

Таблица 5.9 - Приблизительное число нуклеотидных и аминокислотных различий между «диким» вирусом В/СССР/69 и донором аттенуации В/СССР/60/69*

Ген	В60 против В/СССР/69	
	Нуклеотидные замены	Аминокислотные замены
PB2	47	7
PB1	5	4
PA	47	15
HA	45	11
NP	4	3
NA	2	0
M1	20	3
BM2	6	1
NS1	13	5
NS2	6	3
ВСЕГО	195	52

* Данные получены в сотрудничестве с компанией Merck & Co., Inc. (США)

удалось зафиксировать промежуточный мутантный вариант, обладающий одной из качественных характеристик донора аттенуации – температурочувствительностью

репродукции, но сохранивший присущий «дикому» родителю *non-ca* фенотип. Данные по изучению репродуктивных свойств в РКЭ предшественников донора аттенуации В60, различающихся по степени аттенуации, представлены в таблице 5.10. В качестве «дикого» вируса исследован В/СССР/69, хотя его родственные связи с донором В60 не подтвердились, тем не менее по *non-ts/non-ca* фенотипу он соответствует изолятам того временного периода.

Таким образом, была установлена цепочка изменчивости фенотипических свойств лабораторных мутантных вирусов на пути от «дикого» до аттенуированного варианта:

non-ts/non-ca → *ts/non-ca* → *ts/ca*.

Сравнительный молекулярно-генетический анализ *ts/non-ca* и *ts/ca* вариантов дает возможность выявить, по крайней мере, мутации, определяющие холодоустойчивость репродукции донора аттенуации В60/525. Поскольку не представляется возможным найти прямого прародителя донора В60, и таким образом установить мутации, специфичные для становления температурочувствительности донора В60/525, на следующем этапе исследования было проведено выравнивание большого числа аминокислотных последовательностей эпидемических вирусов, взятых из баз данных, с последовательностями секвенированного нами промежуточного варианта В/СССР/17/69 и донора В/СССР/60/69/525 (сиквенс донора В60/525 представлен в табл. В.10 приложения).

Таблица 5.10 - Эволюция признака чувствительности к температуре инкубации в РКЭ от предполагаемого предшественника и известного промежуточного варианта к донору аттенуации В/СССР/60/69

Вирус	Титр в РКЭ, lg ЭИД ₅₀ /мл			Фенотип	
	32°C	38°C	25°C	<i>ca</i>	<i>ts</i>
В <i>wt</i> предшественник ¹	6,7	2,7	≤1,2 ²	<i>non-ca</i>	<i>non-ts</i>
В/СССР/17/69	8,7	4,2	3,7	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
В/СССР/60/69	9,2	3,7	7,7	<i>ca</i>	<i>ts</i>

Примечания. ¹Гипотетический «дикий» вирус-предшественник 1969 года выделения (в качестве примера приведены результаты изучения фенотипа вируса В/СССР/69). Из подобного предшественника в результате серии из 17-ти пассажей при оптимальной температуре был получен вакцинный штамм для взрослых В/СССР/17/69, последующее 60-кратное пассирование которого при пониженной до 25°C температуре привело к формированию *ts/ca/att* вируса В/СССР/60/69.

²Нижний порог чувствительности использованного метода.

5.5.2 ИДЕНТИФИКАЦИЯ УНИКАЛЬНЫХ ЗАМЕН В ГЕНОМЕ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69/525, НЕ ИМЕЮЩИХ АНАЛОГОВ У ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПРИРОДЕ ВИРУСОВ ГРИППА

Для идентификации уникальных мутаций в генах, кодирующих внутренние белки донора аттенуации В60/525, было проведено сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей его белков с соответствующими последовательностями эпидемических вирусов гриппа В, выделенных в период с 1940 до 2006 года и депонированных в Базах данных [7, 8]. Для сравнения первичных последовательностей «диких» и мутантных вирусов гриппа В был выбран вирус гриппа В/Яманаши/166/98.

В общей сложности было проанализировано 45 сиквенсов РВ2 гена, 69 сиквенсов РВ1 гена, 57 сиквенсов РА гена, 108 сиквенсов NР гена, 31 сиквенс М1 гена, 31 сиквенс ВМ2 гена, 87 сиквенсов NS1 гена и 90 сиквенсов NS2 гена. Результаты проведенного анализа суммированы в таблице 5.11.

Сравнение последовательностей генов, кодирующих внутренние белки донора аттенуации В60/525 и эпидемических вирусов гриппа В, позволило установить наличие в первичной структуре генома донора В60/525 восьми кодирующих мутаций, предположительно появившихся в результате пассирования эпидемического родительского вируса в РКЭ при оптимальной и пониженной до 25°C температуре. Это мутации в генах, кодирующих белки РВ2 (три мутации, приведшие к аминокислотным заменам Leu-319-Gln, Glu-467-Gly, Arg-639-Lys), РА (две мутации, приведшие к аминокислотным заменам Ser-149-Asn and Thr-524-Lys), М (две мутации, приведшие к одной аминокислотной замене в белке М1 Arg-167-Lys и одной в белке ВМ2 Ile-87-Val) и NS1 (одна мутация, приведшая к аминокислотной замене Cys-104-Ser). Две из восьми мутаций, одна в позиции 1939 гена РВ2, следствием которой стала аминокислотная замена Arg-639-Lys, а другая - в позиции 1029 гена М, приведшая к аминокислотной замене Ile-87-Val в белке ВМ2, не могут считаться абсолютно уникальными, так как присутствуют и в геномах некоторых более поздних эпидемических вирусов. С другой стороны, они не были обнаружены у вирусов, циркулировавших в тот же временной период - в 1960-1970-х годах (вирусы В/Энн Арбор/1/66, В/Россия/69, В/Гонконг/5/72, В/Гонконг/8/73, В/Сингапур/222/79). В общей сложности гены, кодирующие РНП комплекс донора аттенуации В60/525, содержат четыре уникальных и одну неуникальную мутацию.

Нами не было обнаружено ни одной кодирующей мутации в генах РВ1 и NР донора аттенуации В60/525. Что касается гена РВ1, то его возможная роль в усилении температурочувствительности *ts37^o* клона донора В60/252 описана в подразделе 5.2.2. Результаты фенотипического анализа реассортантов, свидетельствующие о том, что ген NР донора не участвует в формировании *ts* фенотипа, коррелируют с отсутствием мутаций в этом

Таблица 5.11 - Уникальные аминокислотные замены во внутренних белках донора аттенуации *ca/ts* В/СССР/60/69/525 в сравнении с *non-ca/ts* В/СССР/17/69, отстоящим на 17 пассажей от утраченного родительского вируса, и эпидемическими вирусами гриппа В

Ген, кодирующий белок	Позиция аминокислоты (нуклеотид)	<i>non-ca/ non-ts</i> референс- вирус*	<i>non-ca/ ts</i> В/СССР/69/17	<i>ca/ts</i> В/СССР/60/69	Кодирующая мутация			
					появилась после пассирования при t^o	не обнаружена у <i>wt</i> вируса ¹	уникальность мутации	Установленная роль мутантного гена в проявлении <i>ts/ca</i> фенотипа
PB2	319 (979)	Leu	Gln	Gln	32°C	45/45 ²	уникальная	<i>ts</i>
	467 (1423)	Glu	Gly	Gly	32°C	45/45	уникальная	
	639 (1939)	Arg	Arg	Lys	25°C	15/45	не уникальная	
PB1	–	–	–	–	–	69/69	отсутствует	–
PA	149 (475)	Ser	Asn	Asn	32°C	57/57	уникальная	<i>ts/ca</i>
	524 (1600)	Thr	Lys	Lys	32°C	57/57	уникальная	
NP	–	–	–	–	–	108/108	отсутствует	–
M1	167 (524)	Arg	Lys	Lys	32°C	31/31	уникальная	<i>иная</i> ³
BM2	87 (1029)	Ile	Ile	Val	25°C	28/31	не уникальная	–
NS1	104 (345)	Cys	Ser	Ser	32°C	87/87	уникальная	<i>иная</i> ³
NS2	–	–	–	–	–	90/90	отсутствует	–

Примечания. *Вирус гриппа В/Яманаш/166/98 был выбран для сравнения аминокислотных последовательностей «диких» и мутантных вирусов гриппа В. Сиквенсы «диких» вирусов были получены из баз данных [7, 8].

¹Количество «диких» (*wt*) вирусов гриппа В, аминокислотные последовательности белков которых выравнены с последовательностями соответствующих белков вакцинного штамма В/СССР/69/17 и холодоадаптированного донора аттенуации В/СССР/60/69.

²Подобная аминокислотная замена не обнаружена у 45 из 45 проанализированных *wt* вирусов.

³Мутация, не связанная с приобретением *ts/ca* фенотипа.

В сопоставлении данными о том, что за проявление *ts* фенотипа ответственны гены PB2 и PA, за *ca* фенотип отвечает ген PA (см. раздел 5.3, 5.4), адаптационные мутации, появившиеся в белках M1, BM2 и NS1 на протяжении 17 (M1, NS1) либо 60 (BM2) пассажей в куриных эмбрионах, вероятно, связаны с факторами, отличными от влияющих на температурный диапазон репродукции донора.

гене. Обнаруженные мутации в генах M1 (одна), BM2 (одна) и NS1 (одна) также не играют очевидной роли в манифестации *ts* признака. Роль их пока не ясна, возможно, они имеют адаптационный характер другой направленности, не связанной температурными характеристиками донора.

Данные, представленные в таблице 5.12, позволяют дополнительно уточнить возможную роль мутаций в проявлении температурной зависимости клонов донора аттенуации B60. Сравнение *ts/ca* клона донора B60/525 с промежуточным *ts/non-ca* вариантом В/СССР/17/69 дает основания для уточнения роли определенных мутаций. Мы не выявили участия белка PB2 в формировании *ca* фенотипа донора B60, поэтому возможно, что мутация в позиции 639 PB2 ассоциирована со становлением температурочувствительности донора, поскольку отсутствовала у предшественника донора B60, температурочувствительного вакцинного штамма В/СССР/17/69 и проявилась в ходе его дальнейшей температурной адаптации. Не исключено также, что штамм с подобной мутацией Arg-639-Lys мог «выклонироваться» в результате дальнейшего пассирования вакцинного вируса В/СССР/17/69, поскольку он не представляет собой чистую линию. Кроме того, как продемонстрировано в таблице 5.11, эта мутация не является уникальной и была зафиксирована у 15 из 45 исследованных «диких» вирусов, хотя и не встречалась у вирусов временного периода, к которому относится прародитель донора аттенуации.

Таблица 5.12 - Аминокислотные различия в негликозилированных белках *ts/non-ca* вируса В/СССР/17/69 и клонов из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69, различающихся по степени температурочувствительности

Ген, белок	Аминокислотная позиция	B60/252; <i>ca, ts₃₇</i>	B60/525 <i>ca, ts₃₈, non-ts₃₇</i>	В/СССР/17/69 <i>ts₃₈, non-ca</i>	Роль мутации в проявлении фенотипа
PB2	639 ¹	Lys	Lys	Arg	<i>ca?, ts?</i>
PB1	644	Val	Ile	Ile	<i>ts₃₇</i>
PA	459	Ile	Ile	Val	<i>ca</i>
NP	–	–	–	–	нет
M1	167	Lys	Lys	Arg	*
BM2	87	Val	Val	Ile	*
NS1	272	Arg	Arg	His	*
NS2	54	Ala	Ala	Thr	*

Примечания. ¹Мутация не уникальная, встречается у 33% изученных «диких» вирусов более позднего периода циркуляции, поэтому ее роль в проявлении *ca* фенотипа, так же как и в проявлении *ts* фенотипа (табл. 5.11), не однозначна.

*В разделе 5.4 показано отсутствие участия генов M и NS в проявлении *ca* фенотипа.

Мутация Val-459-Ile в аминокислотной позиции белка PA может быть обусловлена формированием холодоустойчивости донора.

Как обосновывалось ранее, мутация Val-644-Ile в аминокислотной позиции белка PB1 коррелирует с усилением температурочувствительности *ts37°* клона B60/252.

Однако, делая подобные заключения, нельзя претендовать на их однозначность. Сравнение вирусов по набору мутаций не позволяет неоспоримо свидетельствовать о роли этих мутаций в проявлении интересующего нас признака. Такие выводы носят гипотетический характер, и будут предметом дальнейших исследований с использованием методов обратной генетики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате продолжительного культивирования вируса гриппа В в РКЭ на пути к созданию донора аттенуации В/СССР/60/69 при пониженной температуре 25°C в гетерогенной популяции *ts/ca* донора сформировались клоны, обладающие различной степенью температурочувствительности. В качестве чистой линии донора аттенуации по совокупности генетических, биологических и иммуногенных характеристик был отобран клон В/СССР/60/69/525. В первичной последовательности генов донора В60/525 выявлено восемь кодирующих мутаций, предположительно появившихся в результате пассирования эпидемического родительского вируса в РКЭ при оптимальной и пониженной температуре.

Результаты изучения реассортантов доноров аттенуации А17 и В60/525 с эпидемическими вирусами гриппа указывают на определяющую роль генов полимеразного комплекса в проявлении чувствительности вирусов к повышению температуры инкубации.

При этом, для приобретения *ts* фенотипа реассортантами вирусов гриппа А обязательным является наследование от донора аттенуации А17 мутантного гена PB2 в сочетании одним из двух других мутантных генов – PB1 или PA.

Приобретение *ts* фенотипа реассортантами вирусов гриппа В обусловлено обязательным наследованием одного из мутантных генов полимеразного комплекса PB2 или PA от донора В60/525. Ген PB1 также участвует в манифестации признака температурочувствительности, приводя к проявлению *ts* фенотипа клона донора В60/252 при более низкой температуре – 37°C. Формирование *ca* фенотипа донора аттенуации В60/525 также связано с геном полимеразного комплекса – PA.

Полученные результаты приводят к выводу о том, что молекулярные основы формирования *ts/ca* фенотипа реассортантных вакцинных вирусов гриппа как А, так и В, на основе отечественных доноров аттенуации едины и определяются генами, кодирующими белки полимеразного комплекса.

ГЛАВА 6 ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

6.1 ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЗНАКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТЕМПЕРАТУРЕ РЕПРОДУКЦИИ КАК ОТРАЖЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Одним из факторов успешной репродукции вирусов гриппа является их широкая приспособляемость к температурному диапазону функционирования организма хозяина.

В условиях эксперимента в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) температурный оптимум репродукции вирусов гриппа человека составляет 32-36°C. В то же время штаммы вируса гриппа человека обладают способностью создавать инфекционное потомство и в более широком диапазоне температур: вирусы гриппа А – при 25-40°C, вирусы гриппа типа В – при 25-38°C. Различные штаммы вирусов гриппа А и В различаются по способности размножаться в определенном интервале температур за пределами оптимальных значений, то есть характеризуются температурочувствительностью либо температуроустойчивостью (*ts/non-ts* фенотип), а также холодоустойчивостью либо холодочувствительностью (*ca/non-ca* фенотип) репродукции.

До начала наших исследований системного анализа эволюции признака температурочувствительности у циркулирующих вирусов не проводилось. Между тем, характеристика вирусов гриппа с позиции такого их биологического свойства как чувствительность к повышению и снижению температуры репродукции имеет научный интерес, углубляющий знания о закономерностях эволюционной изменчивости вирусов гриппа и приближающий к пониманию основ их вирулентности. Без учета этого признака нельзя обойтись и в прикладном аспекте – в работе над созданием аттенуированных реассортантных штаммов для ЖГВ.

Нами проведен ретроспективный анализ эпидемических вирусов гриппа А и В человека, выделенных в разных регионах в различные эпидемические и пандемические циклы и в рамках единичных локальных эпидемий, по способности к репродукции при температурах за пределами оптимальных. Для более обширного охвата данных собственные исследования о температурном фенотипе циркулировавших в прошедшие годы возбудителей гриппа объединены с разрозненными данными литературы. В большинстве своем анализировались штаммы, прошедшие в куриных эмбрионах не более 3-5 пассажей.

Цель предпринятого исследования состоит в выявлении тенденций эволюции биологического признака чувствительности к температуре репродукции у эпидемических вирусов, как отражения эволюции вирусов гриппа в целом.

Всего нами был проведен анализ *ts* фенотип 65 вирусов H1N1, 23 вирусов H2N2, 84 вирусов H3N2 и 62 вирусов В.

6.1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЗНАКА ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А (H1N1) РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ

Согласно результатам собственных исследований и данным литературы, активность репродукции в куриных эмбрионах при повышенной до 40°C температуре варьировала у штаммов сероподтипа H1N1, выделенных в разные годы (таблица Б.2 приложения). Все 8 доступных вирусов, выделенных в течение первых 17-ти лет наблюдения – в период с 1933 до 1949 годов – характеризовались абсолютной температуроустойчивостью (*non-ts* фенотип). Разница в титрах репродукции этих вирусов при оптимальной 32-33°C и повышенной до 40°C температурах не превышала 0,5 – 2,0 lg ЭИД₅₀. Среди 7 исследованных изолятов, выделенных в течение последующих 7 лет (с 1950 по 1956 годы), в заключительный период циркуляции вирусов сероподтипа H1N1 перед пандемией «азиатского» гриппа А (H2N2), наряду со штаммами, устойчивыми к повышению температуры (2 штамма), встречались также чувствительные (4 штамма), один из изолятов (А/Ленинград/53/53) обладал промежуточным $\pm ts$ фенотипом. Вирус А/СССР/90/77 (H1N1), вернувшийся в циркуляцию в 1977 году, после 21-летнего интервала, по нашим данным и по данным Полежаева Ф.И. с соавторами [107] характеризовался *ts* фенотипом (RСТ₄₀=5,0). Однако, в том же году были изолированы и температуроустойчивые антигенно родственные А/СССР/90/77 (H1N1) штаммы, такие как А/Ленинград/322/77 и А/Гонконг/123/77. Примечательно, что вирусы H1N1, вернувшиеся в циркуляцию в 1977 году, характеризовались такой же гетерогенностью по признаку температурочувствительности, как и последние изоляты А (H1N1) 1956 года. Возбудители заболеваний, выделяемые в течение следующих четырех лет – с 1978 по 1981 год – также варьировали по характеризованному признаку. Среди пяти исследованных вирусов этого периода встречались как *ts* (эталонные вирусы А/Бразилия/11/78 и А/Англия/333/80) так и *non-ts* изоляты (А/Калифорния/10/78 и А/Ленинград/322/79), один штамм (А/СССР/03/81) характеризовался $\pm ts$ фенотипом. Два нетипичных штамма А/Киев/271/81 и А/Киев/277/81, выделенные от больных людей 17 и 29 лет, обладали высокой температуроустойчивостью. Они антигенно отличались от циркулировавших в тот временной интервал вирусов и были наиболее близкородственны изоляту из интенсивной эпидемии 1952 года, А/Ленинград/32/52 (H1N1) [71].

Все исследованные изоляты вирусов, циркулировавших в период 1982 – 1989 гг. (8 лет, 20 штаммов), обладали температурочувствительным фенотипом, включая эталонный вирус А/Тайвань/1/86, эпидемические изоляты и группу вирусов, выделенных в межэпидемический период. На смену им опять пришли преимущественно температуроустойчивые вирусы – 80% (8 из 10 изученных), которые выделялись во время эпидемических сезонов 1991 - 1995 годов лишь спорадически (представители А/Техас/36/91, А/Берн/7/95, А/Пекин/262/95). В 1995 году эпидемию гриппа спровоцировали температуроустойчивый А/Техас/36/91 и его дрейфовый вариант температурочувствительный А/Берн/7/95. В 1995 году был также выделен штамм А/Пекин/262/95, сохранивший *non-ts* фенотип своего предшественника А/Техас/36/91. *Non-ts* А/Пекин/262/95-подобные вирусы (например *non-ts* А/Перт/13/95) и *ts* А/Берн/7/95-подобные вирусы (например *ts* А/С-Петербург/92/98) выделялись в течение последующего 10-летнего интервала во время эпидемических сезонов 1996 – 2000 годов, вызывая лишь спорадические случаи гриппа. В 1999 году был выделен в Перу и быстро распространился по миру *non-ts* вирус А/Новая Каледония/20/99 – дрейфовый вариант А/Пекин/262/95 [201]. А/Новая Каледония/20/99 циркулировал и вызывал эпидемии умеренной интенсивности в сезоны 2000/01, 2002/03, 2006/07 годов, а в период преобладания в циркуляции вирусов сероподтипа А(Н3N2) – сезоны 2001/02, 2003/04, 2004/05 и 2005/06 годов вызывал локальные вспышки. Совместная циркуляция вирусов А(Н1N1) – А/Новая Каледония/20/99 и А(Н3N2) – А/Панама/2007/99 привела в 2001/02 году к выделению от больных людей реассортантов А(Н1N2), которые в сезон 2002/03 года составили 30,8% изолятов сероподтипа Н1 (табл. Б.2 приложения). В дальнейшем такие реассортанты эпидемического значения не имели. На фоне циркуляции температуроустойчивого вируса А/Новая Каледония/20/99 в 2001 году выделялись температурочувствительные штаммы, как А/Санкт-Петербург/11/01, А/Астрахань/62/01 и А/Астрахань/68/01. В 2006 году был изолирован температурочувствительный штамм А/Соломоновы острова/03/06, который стал эталоном эпидемического сезона 2007/08, сменив длительно циркулировавший вирус А/Новая Каледония/20/99. Следует отметить, что, как и в заключительный период циркуляции вируса А/Новая Каледония/20/99, с 2005 года, так и во время распространения А/Соломоновы острова/03/06, болели в основном дети. Циркуляцию *ts* вирусов продолжил возбудитель эпидемии 2008/09 года А/Брисбен/59/07. Эти температурочувствительные штаммы, также были эпидемически активны главным образом среди детей в период 2007- 2009 годов, предшествующий пандемии 2009 года.

Таким образом, с 1933 года, на протяжении циркуляции вирусов сероподтипа А(Н1N1), нами было отмечено не менее пяти периодов (волн) колебания признака температурочувствительности штаммов вируса гриппа сероподтипа А (Н1N1) (рис. 6.1).

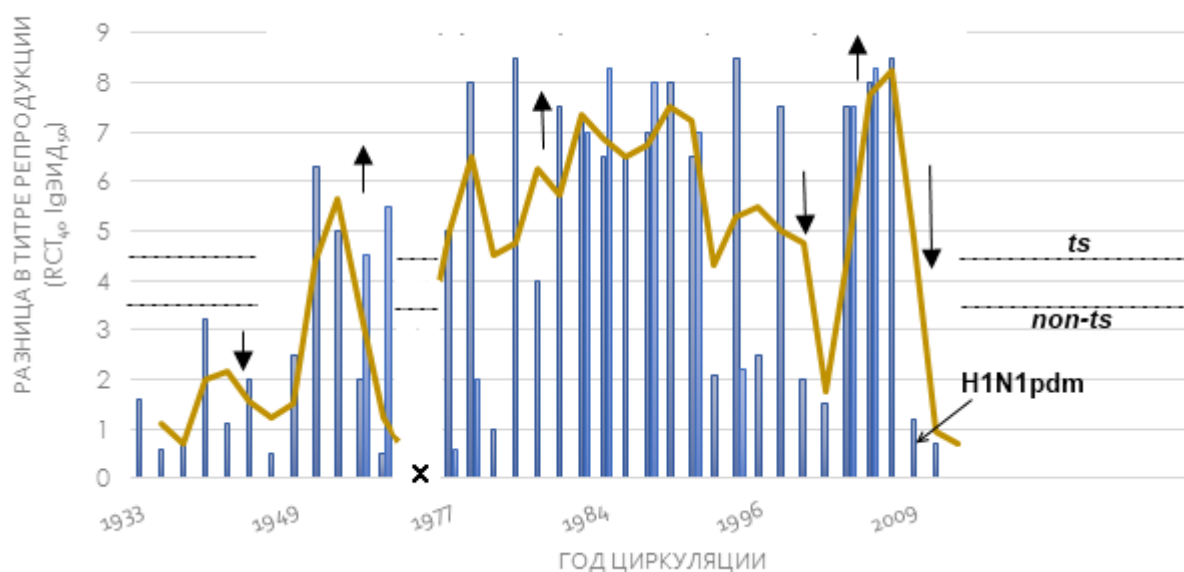


Рисунок 6.1 - Эволюция вирусов гриппа А (H1N1) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 40°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RСТ₄₀). С 1957 по 1977 гг. вирусы А(H1N1) не циркулировали. Кривая линия демонстрирует тенденцию изменчивости исследуемого признака. На рисунках 6.1-6.4 стрелка, направленная вверх, означает рост температурочувствительности, вниз – усиление температуроустойчивости.

С 2006 года выделялись исключительно температурочувствительные вирусы. Они циркулировали вплоть до 2009 года, когда их вытеснил стремительно распространившийся и вызвавший новую пандемию высоко температуроустойчивый вирус А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm. До возникновения пандемии 2009 года из 13 эталонных вирусов, вызвавших эпидемические волны, начиная с 1977 года, 5 (39%) были температуроустойчивыми.

Этот антигенно новый вирус характеризуется высокой репродукцией при 40°C (RСТ₄₀=1,2 lg ЭИД₅₀/мл). Циркуляция вирусов близкородственных А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm продолжается вплоть до настоящего времени, с сохранением температуроустойчивого фенотипа (пример – штамм А/Боливия/559/13).

6.1.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЗНАКА ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H2N2) РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ

Результаты, представленные в таблице Б.3 приложения, свидетельствуют, что все 7 исследованных вирусов сероподтипа А (H2N2), выделявшихся в период от начала пандемического цикла в 1957 году и до 1962 года (первые 6 лет циркуляции) демонстрировали

non-ts фенотип при 40°C. Далее, в течение 1963-1964 годов, циркулировали варьировавшие по температурочувствительности штаммы. Среди них встречались изоляты, как устойчивые (охарактеризовано 2 таких изолята – А/Ленинград/2174/63 и А/Англия/12/64), так и чувствительные к повышенной температуре инкубации (2 изолята – А/Ленинград/2/63, А/Ленинград/2223/63). На заключительном этапе 10-летнего пандемического цикла азиатского гриппа отмечено преобладание в циркуляции температурочувствительных штаммов. Так, из восьми исследованных изолятов 1965 года, выделенных в разных странах, шесть характеризовались температурочувствительностью, хотя в том же году в Ленинграде продолжали циркулировать и устойчивые к повышенной температуре инкубации вирусы (2 изолята – А/Ленинград/147/65 и А/Ленинград/151/65). Наблюдение за штаммами 1966-1967 годов выделения, а это последние годы циркуляции вирусов гриппа А (H2N2), показало, что три из четырех исследованных изолятов характеризовались *ts* фенотипом, один имел $\pm ts$ фенотип. Таким образом, за не такой уж длинный, всего десятилетний пандемический цикл, характеристика штаммов сероподтипа А (H2N2) менялась (рис. 6.2) Если началась пандемия с циркуляции высоко температуроустойчивых возбудителей, то закончилась температурочувствительными, которым предшествовал период выделения варьировавших по своему *ts*-фенотипу вариантов.

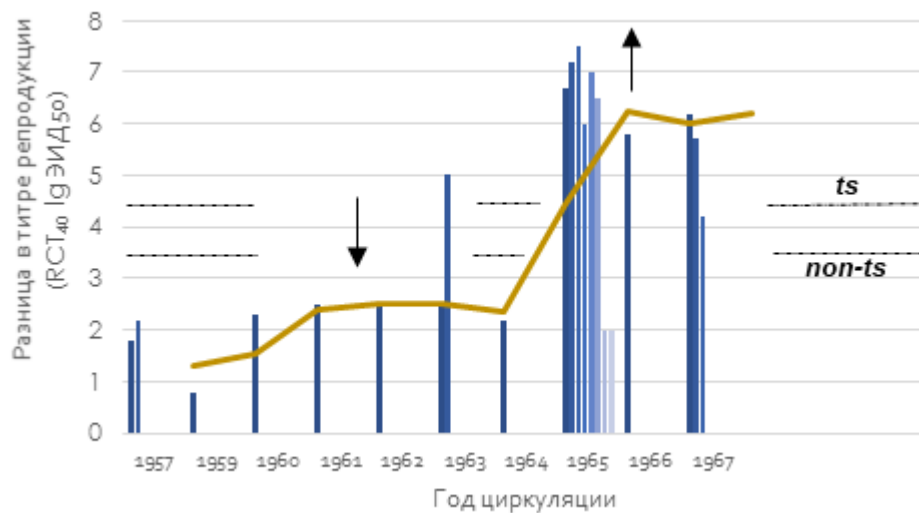


Рисунок 6.2 - Эволюция вирусов гриппа А (H2N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 40°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RСТ₄₀). Кривая линия демонстрирует тенденцию изменчивости исследуемого признака.

6.1.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЗНАКА ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2) РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ

Возбудитель пандемии А (Н3N2) 1968 года А/Гонконг/1/68 характеризовался температуроустойчивостью репродукции при 40°C (таблица Б.4 приложения). Его дрейфовые варианты сохраняли *non-ts* фенотип до 1975 года включительно (проанализировано 7 эталонных вирусов и 3 ленинградских изолята).

Однако в 1975 году, наряду с устойчивыми А/Виктория/3/75, А/Ленинград/10/75, был выделен, в частности, и температурочувствительный штамм А/Хабаровск/29510/75. Среди исследованных 23 изолятов 1976 года 14 (61%) были температурочувствительными, как и их эталонный представитель А/Москва/406/76, 5 штаммов (22%) характеризовались $\pm ts$ фенотипом и 4 (17%) обладали *non-ts* фенотипом.

Эталон эпидемии 1977 года А/Техас/1/77 был температуроустойчив, но уже в 1979 году он уступил место чувствительному к повышенной температуре репродукции вирусу А/Бангкок/1/79 и его антигенной разновидности А/Бангкок/2/79. Температурочувствительные вирусы преобладали в циркуляции до 1984 года. Среди 11 исследованных представителей этого периода *ts* фенотипом характеризовались 8 вирусов (73%), включая эталонный вирус А/Филиппины/2/82, остальные 3 (27%) имели $\pm ts$ фенотип.

В течение 1985-1986 годов наблюдалась гетерогенность циркулирующих штаммов по анализируемому признаку: выделялись температурочувствительные вирусы, такие как эталонные А/Миссисипи/1/85 и А/СССР/2/85, в то же время в Ленинграде были изолированы вирусы, обладающие целым спектром температурочувствительности. Так, из 8 изученных штаммов 4 (50%) характеризовались *non-ts* фенотипом, 2 были *ts* и еще 2 проявляли $\pm ts$ фенотип. Такая гетерогенность по признаку температурочувствительности соответствовала антигенной гетерогенности циркулировавших в этот временной интервал вирусов: встречались изоляты близкородственные А/Техас/1/77, А/Бангкок/1/79 и А/Филиппины/2/82 [21].

В 1987 – 1995 годах продолжилась циркуляция температурочувствительных вирусов, включая эталонные А/Сычуань/2/87, А/Шангдонг/9/93, А/Иоганнесбург/33/94, А/Нанчанг/933/95 и проанализированные межэпидемические изоляты.

Им на смену в 1997 году пришли устойчивые к повышенной температуре штаммы, циркуляция которых прослежена нами до 1999 года (представители – эталонные вирусы А/Сидней/5/97, А/Панама/2007/99, А/Москва/10/99).

С 2000 по 2004 год попеременно и одновременно циркулировали вирусы, различающиеся по температурочувствительности.

Примечательно, что накануне пандемии, начиная с 2005 года и по 2009 год включительно, циркулирующие штаммы характеризовались чувствительным к повышению температуры фенотипом (А/Висконсин/67/05, А/Брисбен/10/07, А/Перт/16/09).

В 2011 году в США появился реассортантный вирус свиного гриппа А/Индиана/10/11(Н3N2)v с геном М от штамма А (Н1N1)pdm2009. В период 2011-2013 годов свиной вирус был причиной 335 случаев заболеваний с одним смертельным исходом, но до сих пор этот вирус эпидемического значения не приобрел. После 309 случаев заболеваний в 2012 году его циркуляция снизилась до 19 эпизодов в 2013-м, 3-х в 2014 и 2 в 2015 [166]. По результатам наших исследований возбудитель был высоко термостойчив.

Эталонный вирус А/Виктория/361/11, также выделенный в 2011 году, отличался высокой эпидемической активностью в сезон 2012/13 года, заняв нишу отступившего на время А (Н1N1)pdm2009. Он обладал также *non-ts* фенотипом. Аналогичными по термостойкости были антигенно близкие штамму А/Виктория/361/11 изоляты 2012 года А/Гавайи/22/12 и А/Огайо/02/12. Интересно, что другой антигенный аналог А/Виктория/361/11 вирус А/Техас/50/12, который был выбран кандидатом в вакцину на эпидемический сезон 2013/14 года, поскольку А/Виктория/361/11 приобрел мутацию в антигенном сайте НА в процессе накопления в куриных эмбрионах, отличался температурочувствительностью репродукции. Всего, из 23 проанализированных эталонных штаммов *non-ts* фенотипом обладали 11 (48%).

Представленная в сводной таблице 6.1 характеристика способности вирусов гриппа А к репродукции при трех температурах, превышающих оптимальную, наглядно демонстрирует постепенное снижение термостойкости эволюционирующих вирусов гриппа А (Н3N2). Если в начале пандемического цикла вирусы обладают *non-ts* фенотипом при 40°C, то вирус 1979 года (А/Бангкок/1/79) уже характеризуется температурочувствительностью при этой температуре, сохраняя устойчивость к 38°C. С течением времени порог термостойкости вирусов снижается, появляется все больше *ts40°* штаммов, которые также приобретают чувствительность к 39°C, а затем и к 38°C. Накануне пандемии, вызванной вирусом А(Н1N1)pdm2009, эпидемические Н3N2 штаммы отличались высокой температурочувствительностью. Возможно, это стало благополучным фоном для распространения более сильного пандемического патогена с новыми антигенными характеристиками. Вновь появление после 2009 года устойчивых к репродукции при 40°C Н3N2 штаммов, вероятно, свидетельствует о выходе вирусов на новый виток эволюции. Усиление вызываемого ими эпидемического процесса привело к тому, что в 2011-2015 годах представители Н3N2 циркулировали наравне, и даже вытесняли Н1N1pdm2009 в ряде регионов (табл. 2.1).

Эволюция вирусов гриппа А (H3N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при 40°C представлена на рис. 6.3. Эволюция представляется как волнообразная (циклическая) смена циркулирующих фенотипов: *non-ts* → *ts+non-ts* → *ts* → *non-ts*.

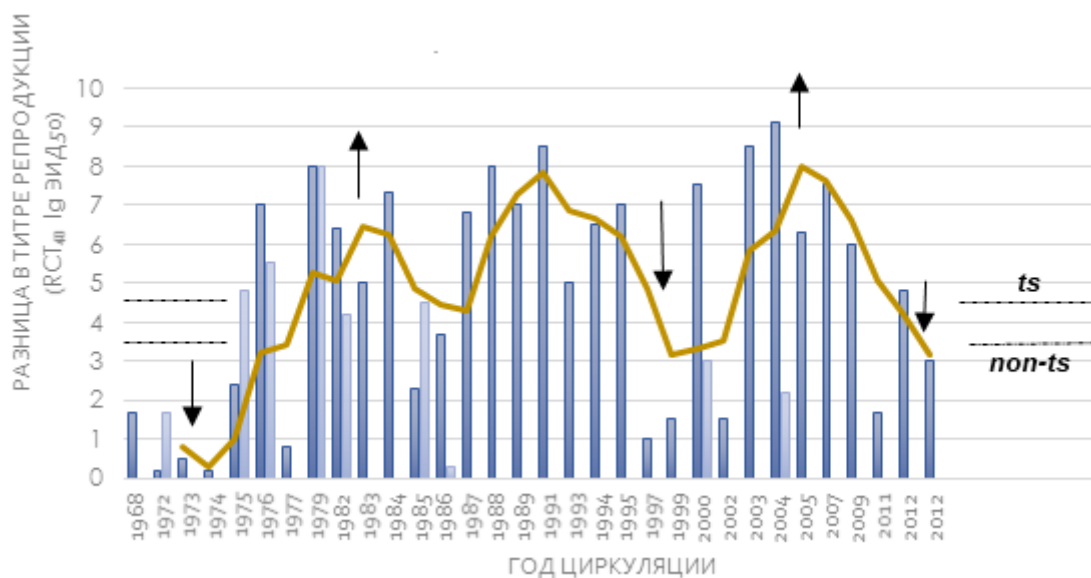


Рисунок 6.3 - Эволюция вирусов гриппа А (H3N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 40°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RСТ₄₀). Кривая линия демонстрирует тенденцию изменчивости исследуемого признака.

6.1.4 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЗНАКА ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА В РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ

Нами прослежена эволюция признака температурочувствительности репродукции в РКЭ у вирусов гриппа В от ранних представителей до современных вирусов линий В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88. Анализ диапазона репродукции штаммов вируса гриппа В, выделенных с 1940 по 2013 год, показал, что они не однородны признаку температурочувствительности. Многие вирусы гриппа В, разошедшиеся на две ветви, вообще утратили способность к репродукции в РКЭ при температуре 38°C, свойственную «ранним» представителям, и верхняя ограничительная температура, при которой еще возможно выявлять репродукцию вируса, снизилась у них до 37°C. Поэтому для более точной характеристики репродукции, в большинстве случаев, анализ температурочувствительности проводили при 37°C и 38°C (приложение В, табл. 5).

Таблица 6.1 - Характеристика температурочувствительности эпидемических штаммов вируса гриппа А в развивающихся куриных эмбрионах при температурах инкубации превышающих оптимальные значения

Вирус	Фенотип при температуре		
	38°C	39°C	40°C
<i>Эпидемический вирус сероподтипа А(Н1N1)</i>			
А/PR/8/34	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/СССР/90/77	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Ленинград/322/79	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Тайвань/1/86	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Техас/36/91	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Пекин/262/95	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Берн/7/95	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Новая Каледония/20/99	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Соломоновы острова/3/06	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Брисбен/59/07	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Калифорния/07/09 _{pdm}	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Боливия/559/13	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
<i>Эпидемический вирус сероподтипа А(Н3N2)</i>			
А/Гонконг/1/68	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Виктория/35/72	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/82/76	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Техас/1/77	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Бангкок/1/79	<i>non-ts</i>	н.и. ¹	<i>ts</i>
А/Сидней/5/97	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Филиппины/2/82	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Ленинград/234/84	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Ленинград/111/85	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Сычуань/2/87	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Закарпатье/354/89	<i>non-ts</i>	н.и.	<i>ts</i>
А/Пуэрто-Рико/11/20/90	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Иоганнесбург/33/94	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Веллингтон/01/04	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Малайзия/01/04	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Висконсин/67/05	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ts</i>
А/Перт/16/2009	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>
А/Виктория/361/11	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Индиана/10/11(Н3N2) _v	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Гавайи/22/12	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>
А/Техас/50/12	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>
А/Огайо/02/12	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>

¹н.и. – не исследовали. Цветом выделены вирусы, характеризующиеся *non-ts* фенотипом.

Исследованные нами штаммы по положению в эволюционном ряду распределились следующим образом: изучено 12 штаммов, выделенных до расхождения вирусов гриппа В на две эволюционные ветви, 25 В/Ямагата/16/88-подобных штаммов и 25 В/Виктория/1/87-подобных штаммов.

Приведенные в таблице В.5 приложения данные подтверждают имеющиеся в литературе свидетельства о том, [75, 374, 399], что штаммы вируса гриппа В ранних лет выделения обладали *non-ts* фенотипом. Из 12 проанализированных вирусов, выделенных в 1940-1976 годах, лишь два изолята (В/Ленинград/95/59 и В/Ленинград/14/3/76) слегка уступали остальным и проявляли умеренную температуроустойчивость ($\pm ts$) при 38°C. К температуре 37°C 100% вирусов были устойчивы.

В 1980-х годах и на протяжении всех последующих лет наблюдения, мы констатировали тенденцию к увеличению количества температурочувствительных штаммов среди представителей обеих эволюционных ветвей.

Среди вирусов линии «Виктория» 99% циркулирующих в 1983-1986 годах вирусов, обладали *ts* фенотипом, как и их эталонный представитель В/СССР/100/83. Отдельные температуроустойчивые штаммы выделялись лишь спорадически (как межэпидемический изолят В/Ленинград/693/83 или эпидемический В/Ленинград/104/84). Всего в этот период имеется информация о 174 изолятах из Санкт-Петербурга [21] и 3-х изолятах из других географических регионов.

«Викторианский» изолят В/Энн Арбор/1/86, бывший эталоном в эпидемический период 1987-1989 гг., обладал *non-ts* фенотипом, в отличие от других изолятов 1985-1986 года (В/Киев/2186/85, В/Рига/3968/86, В/Энн Арбор/2/86), которые характеризовались температурочувствительностью уже при 37°C.

Из представителей «Викторианской» линии, выделенных на протяжении с 1987 по 2013 гг., штаммы 1987-2004 годов варьировали по своей температурочувствительности. 7 из 10 штаммов (70%) были температуроустойчивыми при 37°C, 3 штамма сохраняли устойчивость, и один был умеренно температуроустойчивым при 38°C (40%), остальные 30% оказались температурочувствительными.

Следующие 7 лет, с 2005 по 2011 годы, возбудителями эпидемий были исключительно температурочувствительные штаммы. Лишь изолят 2013 года вновь демонстрировал *non-ts* фенотип.

Из 7-ми эталонных вирусов температуроустойчивыми при 37°C оказались 5 (71%), а при 38°C сохранили *non-ts* фенотип 3 или 4 (нет данных о вирусе В/Энн Арбор/1/86), что составляет 43-57%.

Рассматривая эволюцию признака температурочувствительности у вирусов линии «Ямагата», выделенных в 11-летний период, с 1988 по 1998 годы, следует отметить попеременную циркуляцию устойчивых и чувствительных к температуре инкубации штаммов. Из 7 исследованных вирусов 4 характеризовались температуроустойчивостью при 37°C (57%), у двух из них наблюдалась тенденция к снижению устойчивости при 38°C ($\pm ts$), три были температурочувствительными уже при 37°C, как и сам репрезентативный штамм линии В/Ямагата/16/88. Изолят 1989 года и эталонный вирус В/Панама/45/90 были устойчивы к температуре 37°C, а при 38° умеренно температуроустойчивы. Эталонный вирус В/Пекин/184/93 и его представители В/Харбин/07/94, В/Санкт-Петербург/92/95 варьировали по температурочувствительности (*ts*, *non-ts*, *ts* соответственно). Следующий эталонный вирус В/Яманаси/166/98 был *non-ts*. В группе из 10 В/Сичуань/379/99- подобных вирусов 8 (80%) оказались температурочувствительными, как и их эталон, однако 2 вируса были устойчивы к репродукции при 37°C, а при 38°C варьировали по степени температурочувствительности: от $\pm ts$ (В/Улан-Уде/3/01) до *ts* (В/Виктория/504/00). Все вирусы возбудители эпидемий 2002-2011 годов оказались высоко температурочувствительными. Эталонный *non-ts* вирус вновь появился в циркуляции лишь в 2012 году (В/Массачусеттс/2/12).

Всего же, из 25 проанализированных вирусов линии «Ямагата» только 7 (28%) оказались температуроустойчивыми при 37°C, два из них сохраняли *non-ts* фенотип при 38°C, и еще у двух при 38°C температуроустойчивость понизилась до умеренной ($\pm ts$).

Что касается эталонных вирусов линии «Ямагата», то при 37°C 44% (4 из 9) из них обладали *non-ts* фенотипом, а при 38°C – 22% (2 из 9) оказались температуроустойчивыми, и еще 22% характеризовались $\pm ts$ фенотипом.

Суммируя описанные характеристики температуроустойчивости репродукции у вирусов гриппа В, можно сделать вывод о том, что при общей тенденции к снижению порога устойчивости к температуре инкубации, представители эволюционной ветви «В/Виктория/2/87» чаще обладали более выраженным *non-ts* фенотипом по сравнению с вирусами ветви «В/Ямагата/16/88», но уступали по этому признаку стабильно температуроустойчивым «ранним» вирусам гриппа В (табл. 6.2).

Сравнительный анализ температуроустойчивости репродукции эпидемических штаммов вируса гриппа В при 37°C, циркулировавших с 1940 по настоящее время, позволяет более детально проследить эволюцию *ts* признака, и также, как у вирусов гриппа А, заметить наличие определенной цикличности (рис. 6.4). Так, вирусы 1940-х – 1970-х годов выделения в подавляющем большинстве представляли собой температуроустойчивые варианты, на смену им пришли варьирующие по *ts* фенотипу «Викторианские» штаммы, их сменили тоже

Таблица 6.2 -Эволюция температуроустойчивости репродукции в развивающихся куриных эмбрионах вирусов гриппа В

<i>non-ts</i> фенотип при 38°C	<i>non-ts</i> фенотип при 37°C
100% «ранних» вирусов гриппа В	100% «ранних» вирусов гриппа В;
50% эталонных вирусов В «Виктория»	71% эталонных вирусов В «Виктория»
22% эталонных вируса В «Ямагата»	44% эталонных вирусов В «Ямагата»
22% В «Ямагата» $\pm ts$	

варьирующие по температурочувствительности вирусы линии «Ямагата». После 2002 года все циркулирующие вирусы ветви «Ямагата» были температурочувствительными. Также температурочувствительностью характеризовались все циркулировавшие с 2005 года «Викторианские» вирусы. Промежуток времени, когда в циркуляции одновременно находились вирусы, обладающие *ts* и *non-ts* фенотипом, можно рассматривать как переходный период от температурорезистентных к температурочувствительным вирусам. Вновь температуроустойчивые вирусы появились в циркуляции в 2012 (В/Массачусеттс/2/12, линия «Ямагата») и в 2013 гг. (В/Техас/02/13, линия «Виктория»).

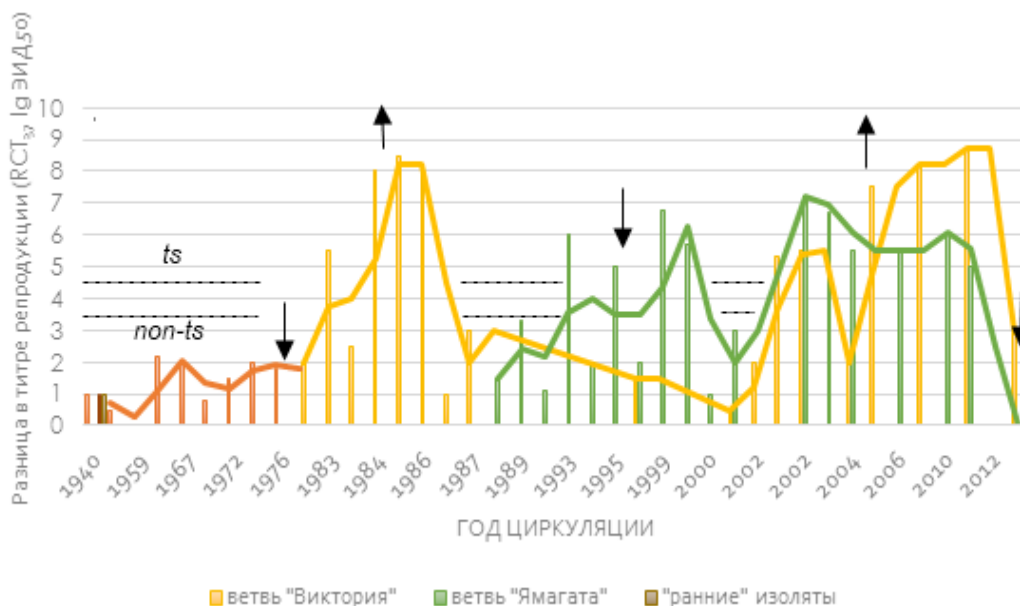


Рисунок 6.4 - Эволюция вирусов гриппа В по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 40°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RСТ₄₀). Кривая линия демонстрирует тенденцию изменчивости исследуемого признака.

6.1.5 ОЦЕНКА ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СОЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИГЕННО ОДНОРОДНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Исследование ростовых характеристик штаммов вирусов гриппа А и В, одновременно циркулирующих в одном географическом регионе, на примерах выборочно изученных эпидемий последних 10 лет позволило получить дополнительную информацию о фенотипических особенностях современных эпидемических штаммов.

Так, среди 14 изолятов 1996 года из эпидемии в Ленинграде, антигенно родственных эталонному вирусу А/Москва/406/76 (Н3N2), 10 характеризовались температурочувствительностью при 40°C (71%), как их антигенный прототип (табл. 6.3), 3 обладали промежуточным $\pm ts$ фенотипом, а один (А/Ленинград/82/76) демонстрировал температуроустойчивость репродукции.

В таблице 6.4 представлена характеристика штаммов А(Н3N2), выделенных в эпидемию 1979/80 года в трех регионах: в Москве, Риге и городах ГДР. Помимо характеристики температурочувствительности и антигенных свойств, у этих штаммов охарактеризован состав генома. Эпидемические изоляты из ГДР оказались антигенно, генетически и фенотипически однородными и не отличались от своего эталонного прототипа А/Бангкок/1/79, демонстрируя температурочувствительность репродукции при 40°C. Среди изолятов из эпидемии в Риге, 6 из 7-ми штаммов также были по всем параметрам идентичны эталону А/Бангкок/1/79, тогда как один температурочувствительный изолят по антигенности и составу генома был сходен с вирусом А/Бангкок/2/79, также характеризующимся ts фенотипом. Как показал анализ генома, в Москве, в эпидемический сезон 1979/80 года одновременно циркулировали штаммы вируса гриппа серотипов Н1N1 и Н3N2, причем среди вирусов А(Н3N2) были изолированы штаммы антигенно родственные как эталонному вирусу этой эпидемии А/Бангкок/1/79 (А/Москва/1472/79), так и возбудителям эпидемий прошлых лет. Эти штаммы легко вступали в реассортацию с циркулирующими вирусами сероподтипа Н1N1. Из одного коллектива были выделены штаммы А/Москва/1192/79 и А/Москва/1849/79, сходные по составу генома и антигенности с эталонным вирусом 1977-1979 годов А/Техас/1/77. Также, как А/Техас/1/77, эти изоляты характеризовались температуроустойчивостью репродукции при 40°C. Другая группа генетически и антигенно сходных изолятов (А/Москва/1662/79, А/Москва/2146/79, А/Москва/28/80 и А/Москва/29/80) характеризовалась высокой температуроустойчивостью при 40°C, но при этом отличалась антигенно и генетически от всех эталонных вирусов того периода.

Среди вирусов сероподтипа А(Н1N1) в эпидемический сезон 1979/80 года в Москве (табл. 6.5) циркулировали штаммы антигенно и генетически близкородственные эталонному ts вирусу А/Бразилия/11/78, как А/Москва/1366/79 (ts), а также реассортанты, подобные

А/Москва/2175/79, который унаследовал гены, кодирующие белки полимеразного комплекса PB2, PB1, PA и NP от вируса А/Бангкок/1/79 (H3N2), а гены HA, NA, M и NS от вируса А/Бразилия/11/78 (H1N1). Интересно было бы дифференцировать гены, ответственные за проявление *ts* фенотипа у естественных реассортантов, но, к сожалению оба родителя реассортанта А/Москва/2175/79 оказались в равной степени температурочувствительными. В эпидемический сезон 1981/82 года циркулировали вирусы антигенно и генетически сходные с эталоном А/Англия/333/80 (H1N1). Они также характеризовались *ts* фенотипом (табл. 6.5).

Репродукцию следующих групп изолятов вирусов гриппа дополнительно проверяли при двух повышенных температурах репродукции: 38°C и 40°C для вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) и также 37°C и 38°C для вирусов гриппа В.

Таблица 6.3 - Температурочувствительность репродукции в куриных эмбрионах вирусов гриппа А(H3N2), изолированных в один эпидемический сезон 1976 года в Ленинграде

Вирус	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t°		RCT ₄₀	фенотип
	33°C	40°C		
<i>Эталонный вирус, которому соответствуют изоляты</i>				
А/Москва/406/76	9,2	4,0	5,2	<i>ts</i>
<i>Изоляты из эпидемии</i>				
А/Ленинград/58/76	7,5	2,5	5,0	<i>ts</i>
А/Ленинград/59/76	5,3	1,3	4,0	$\pm ts$
А/Ленинград/62/76	4,5	0,2	4,3	$\pm ts$
А/Ленинград/64/76	6,5	0,2	6,3	<i>ts</i>
А/Ленинград/65/76	6,0	$\leq 1,2$	6,0	<i>ts</i>
А/Ленинград/67/76	6,0	$\leq 1,2$	6,0	<i>ts</i>
А/Ленинград/80/76	6,5	0,2	6,3	<i>ts</i>
А/Ленинград/81/76	7,5	2,5	5,0	<i>ts</i>
А/Ленинград/82/76	7,7	6,2	1,5	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/83/76	6,3	2,3	4,0	$\pm ts$
А/Ленинград/84/76	8,5	0,2	8,3	<i>ts</i>
А/Ленинград/85/76	6,5	$\leq 1,2$	6,5	<i>ts</i>
А/Ленинград/128/76	6,0	$\leq 1,2$	6,0	<i>ts</i>
А/Ленинград/180/76	7,0	$\leq 1,2$	7,0	<i>ts</i>

Таблица 6.4 - Температурочувствительность репродукции в куриных эмбрионах вирусов гриппа А(Н3N2), изолированных в один эпидемический сезон 1979/80 года в Москве, Риге и в Германии

Вирус	Титр вируса при оптимальной t 33°C (lg ЭИД ₅₀ /мл)	RCT ₄₀	Фенотип
<i>Изоляты из одного коллектива в Москве соответствующие эталону А/Техас/1/77</i>			
А/Москва/1192/79	9,2	0,5	<i>non-ts</i>
А/Москва/1849/79	9,7	0,5	<i>non-ts</i>
<i>Изоляты из одного района Москвы антигенно наименее удаленные от эталона А/Москва/406/76(1/4 титра)</i>			
А/Москва/1662/79	9,2	0	<i>non-ts</i>
А/Москва/2146/79	9,2	0,5	<i>non-ts</i>
А/Москва/28/80	9,7	0	<i>non-ts</i>
А/Москва/29/80	8,2	0	<i>non-ts</i>
<i>Изолят из эпидемии в Москве соответствующий эталону А/Бангкок/1/79</i>			
А/Москва/1472/79	8,2	5,5	<i>ts</i>
<i>Изоляты из эпидемии в Латвии соответствующие эталону А/Бангкок/1/79</i>			
А/Рига/1/79	7,7	7,0	<i>ts</i>
А/Рига/3/79	7,7	7,0	<i>ts</i>
А/Рига/4/79	8,7	7,5	<i>ts</i>
А/Рига/5/79	7,2	7,0	<i>ts</i>
А/Рига/6/79	8,2	7,0	<i>ts</i>
А/Рига/7/79	8,7	7,0	<i>ts</i>
<i>Изолят из эпидемии в Латвии соответствующий эталону А/Бангкок/2/79</i>			
А/Рига/2/79	8,2	7,5	<i>ts</i>
<i>Изоляты из эпидемии в Германии соответствующие эталону А/Бангкок/1/79</i>			
А/Грейфсвальд/8/80	7,7	7,2	<i>ts</i>
А/Грейфсвальд/9/80	7,7	7,2	<i>ts</i>
А/Грейфсвальд/10/80	8,2	7,5	<i>ts</i>
А/Берлин/5/80	8,2	7,2	<i>ts</i>
А/Потсдам/9/80	7,2	7,5	<i>ts</i>
А/Дрезден/1/80	7,7	7,2	<i>ts</i>
<i>Эталонные вирусы, которым соответствуют изоляты</i>			
А/Москва/406/76	9,2	5,2	<i>ts</i>
А/Техас/1/77	9,2	0,5	<i>non-ts</i>
А/Бангкок/1/79	9,7	7,7	<i>ts</i>
А/Бангкок/2/79	9,7	7,7	<i>ts</i>

Таблица 6.5 - Характеристика вирусов гриппа А(Н1N1), изолированных в эпидемические сезоны 1979/80 и 1981/82 годов в Москве, по признаку устойчивости репродукции при повышенных температурах в куриных эмбрионах

Вирус	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при оптимальной t 36°C	RCT ₄₀	фенотип
<i>Эталонный вирус, которому соответствуют изоляты 1979/80 гг.</i>			
А/Бразилия/11/78 (Н1N1)	8,7	8,0	ts
А/Бангкок/1/79** (Н3N2)	9,7	7,7	ts
<i>Изоляты</i>			
А/Москва/1366/79 (Н1N1)	8,2	7,5	ts
А/Москва/2175/79*(Н1N1)	8,7	7,0	ts
<i>Эталонный вирус, которому соответствуют изоляты 1981/82 гг.</i>			
А/Англия/333/80 (Н1N1)	9,2	8,5	ts
<i>Изоляты</i>			
А/Москва/45/81 (Н1N1)	6,2	7,5	ts
А/Москва/46/81 (Н1N1)	7,7	7,0	ts
А/Москва/9058/81 (Н1N1)	8,2	7,7	ts
А/Москва/9085/82 (Н1N1)	8,7	8,0	ts

*Этот изолят представляет собой реассортант между вирусами серотипов Н1N1 и Н3N2, унаследовавший гены полимеразного комплекса PB2, PB1, PA и NP от вируса В/Бангкок/1/79 (Н3N2), а гены HA, NA, M и NS от вируса А/Бразилия/11/78 (Н1N1), одновременно циркулировавшими в эпидемию 1979/80 гг.

**Источник генов полимеразного комплекса PB2, PB1, PA и NP у реассортанта А/Москва/2175/79 (Н1N1).

Все 8 исследованных антигенно однородных изолятов А(Н1N1) из эпидемии 1998 года в Санкт-Петербурге (табл. 6.6) практически не репродуцировались при температуре 40°C. Для них, как и для их прототипа А/Пекин/262/95, температура 40°C оказалась непермиссивной. При понижении температуры инкубации до 38°C, семь из них достаточно хорошо размножались (RCT₃₈ 1.0 – 2.5 lg ЭИД₅₀/мл), как и их прототип. Один из изолятов, однако, несколько отличался от социркулирующих вирусов, обладая сниженной температуроустойчивостью и при 38°C (А/Санкт-Петербург/103/98, ±ts).

Что касается штаммов А (Н3N2) из эпидемии 1999 – 2000 года в Санкт-Петербурге, все восемь исследованных изолятов не репродуцировались при 40°C, хотя их антигенный прототип А/Сидней/5/97, выделенный тремя годами ранее, характеризовался при этой температуре

Таблица 6.6 - Характеристика вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2), выделенных в течение двух эпидемий 1998 и 2000 годов в Санкт-Петербурге, по признаку устойчивости репродукции при повышенных температурах в РКЭ

Вирус	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /мл при t°			фенотип при t°	
	32°C	38°C	40°C	38°C	40°C
Эталонный вирус А/Пекин/262/95 (H1N1)	8,2	7,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/14/98	9,2	6,2	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/35/98	5,7	3,2	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/73/98	8,2	7,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/77/98	10,2	7,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/89/98	9,7	8,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/100/98	8,2	5,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/101/98	9,2	8,2	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/103/98	6,2	2,7	≤1,2	±ts	ts
Эталонный вирус А/Сидней/5/97 (H3N2)	10,8	10,8	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/120/00	9,2	9,2	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/127/00	7,7	4,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/128/00	7,2	7,7	2,7	non-ts	ts
А/С-Петербург/147/00	7,2	6,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/164/00	8,2	8,2	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/181/00	10,2	10,2	3,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/183/00	9,2	7,7	≤1,2	non-ts	ts
А/С-Петербург/186/00	8,2	5,7	≤1,2	non-ts	ts

высокой температуроустойчивостью (RCT₄₀ 1,0 lg ЭИД₅₀/мл). При повышенной температуре инкубации 38°C изоляты сохраняли температуроустойчивость (RCT₃₈ 0 – 2.5 lg ЭИД₅₀/мл), характерную для их антигенного прототипа (табл. 6.6). Исследование репродукции этой группы изолятов при нескольких повышенных температурах позволило заметить тенденцию эволюции признака температурочувствительности при продолжающемся сохранении антигенного родства изолятов с прототипом.

Были исследованы штаммы вируса гриппа В, циркулирующие совместно в один эпидемический сезон 1995-1996 года. Это 14 изолятов из 11-ти разноудаленных друг от друга штатов США, и 7 более тесно социркулирующих изолятов, выделенных в Санкт-Петербурге. Все штаммы, как Санкт-Петербургские, так и американские были антигенно идентичны эталонному температурочувствительному вирусу гриппа линии «Ямагата» – В/Пекин/184/93 (табл. 6.7).

Таблица 6.7 - Характеристика температуро- и ингибиторочувствительности В/Пекин/184/93-подобных вирусов, выделенных в эпидемию 1995-1996 года в России (Санкт-Петербург) и в США

Вирусы	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /мл			ts фенотип 32°/37°	Чувствительность к ингибиторам (титр*)
	32°C	37°C	38°C		
<i>Эталонный вирус</i>					
В/Пекин/184/93	7,2	1,2	≤1,2	ts	is (640)
<i>Вирусы, выделенные в эпидемию 1995-1996 года в Санкт-Петербурге (Россия)</i>					
В/Санкт-Петербург/184/95	9,2	1,7	≤1,2	ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/185/95	8,2	2,7	≤1,2	ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/198/95	8,2	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/202/95	7,7	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/206/95	8,2	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/209/95	9,0	8,2	≤1,2	non-ts	is (1280)
В/Санкт-Петербург/221/95	8,2	2,2	≤1,2	ts	is (1280)
<i>Вирусы, выделенные в эпидемию 1995-1996 года на территории США</i>					
В/Айова/03/95	7,3	4,5	≤1,2	non-ts	is (1280)
В/Южная Дакота/04/96	6,8	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Техас/11/96	6,2	0,6	≤1,2	ts	is (1280)
В/Аляска/01/96	7,4	3,1	≤1,2	± ts	is (2560)
В/Теннесси/01/96	7,5	≤1,2	≤1,2	ts	is (2560)
В/Луизиана/01/96	7,5	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Флорида/02/96	7,5	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Пенсильвания/02/96	6,3	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Вашингтон/01/96	8,0	5,1	≤1,2	non-ts	is (1280)
В/Висконсин/02/96	6,3	≤1,2	≤1,2	ts	is (5120)
В/Висконсин/03/96	5,8	≤1,2	≤1,2	ts	is (5120)
В/Висконсин/04/96	5,0	≤1,2	≤1,2	ts	is (1280)
В/Висконсин/05/96	6,5	≤1,2	≤1,2	ts	is (2560)
В/Нью Йорк/01/96	6,5	≤1,2	≤1,2	ts	is (640)

* обратная величина титра ингибирования вируса неиммунной сывороткой крови лошади, прогретой 10 мин при 80°C, в РТГА

При исследовании фенотипа изолятов из Санкт-Петербурга и США оказалось, что все они чувствительны к температуре 38°C. Однако при снижении температуры инкубации до 37°C их удалось дифференцировать по степени температурочувствительности. Изоляты из США, в основном (11 из 14), были чувствительны к 37°C, как и их прототип, тогда как 3 изолята оказались в разной степени температуроустойчивыми.

Приблизительно такое же соотношение температурочувствительных и температуроустойчивых штаммов было обнаружено у изолятов эпидемии в Санкт-Петербурге. Шесть из них оказались ts при 37°C, а один проявлял non-ts фенотип.

Таким образом, удалось продемонстрировать, что современные вирусы гриппа А и В, изолированные в один эпидемический сезон и даже на протяжении одной локальной вспышки, могут отличаться по степени своей температурочувствительности. Это может быть обусловлено разными причинами: при антигеном сходстве может иметь место гетерогенность популяции из-за дрейфа генов, определяющих *ts* фенотип. Возможна природная реассортация социркулирующих штаммов одного или разных сероподтипов, что было отмечено нами в эпидемию 1997/1998 года в Москве. Еще одной из причин может быть выделение в эпидемический сезон продолжающих ограниченно циркулировать возбудителей эпидемий прошлых лет.

6.1.6 ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА ПО ПРИЗНАКУ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ РЕПРОДУКЦИИ

Среди исследованных эпидемических вирусов гриппа А и В встречаются штаммы, характеризующиеся, в той или иной мере, способностью к репродукции при пониженной температуре 25-26°C. Холодоустойчивость ($RCT_{25} \leq 3,5 \lg ЭИД_{50}/мл$) изученных по этому признаку «диких» вирусов гриппа сочеталась с устойчивостью либо с чувствительностью к повышенной температуре инкубации (табл. 6.8). Роль выявленной нами холодоустойчивости некоторых природных изолятов и даже эталонных вирусов гриппа не исследована, однако сопоставление с селективно полученными *ts/ca* донорами аттенуации дает основания предполагать, что *ca* фенотип «диких» вирусов в сочетании с температурочувствительностью, является опосредованным указанием на их естественную аттенуацию. Тогда как вирусы, проявляющие *non-ts/ca* фенотип, вероятно, способны к репродукции в широком диапазоне температур, позволяющей им инфицировать как верхние, так и нижние отделы респираторного тракта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Анализ температурочувствительности репродукции продемонстрировал вариабельность оцениваемого признака у циркулирующих вирусов всех сероподтипов гриппа А и линий вирусов гриппа В, выявил явную общую тенденцию к преобладанию среди эпидемических вирусов температурочувствительных штаммов, снижение порога устойчивости к повышенной температуре. Анализ температурочувствительности сходных по антигенности изолятов из одной эпидемии продемонстрировал факты возможного разнообразия социркулирующих вирусов по *ts* фенотипу. Не все, выявляемые в сообществах варианты вирусов, могут продолжить свою эволюцию. Многие из них в своем развитии являются тупиковыми, у других дрейф биологических свойств закрепился и продолжился. Однако, несомненно, что о путях эволюции признака можно судить по разнообразию прослеживаемых тенденций.

Таблица 6.8 - Характеристика различий по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при температурах за пределами оптимальных у представителей эпидемических вирусов гриппа А и В (сводные данные по таблицам Б.2-Б.5 и 7.2-7.4)

Характеристика фенотипа эпидемических вирусов гриппа А и В (<i>ts</i> 39° / <i>ca</i> 25°С-для вирусов гриппа А; <i>ts</i> 38° / <i>ca</i> 25°С-для вирусов гриппа В)	
<i>non-ts/non-ca</i>	А/Ленинград/134/57 (Н2Н2) А/Новая Каледония/20/99 (Н1Н1) А/Техас/1/77 (Н3Н2) А/Виктория/361/11(Н3Н2) В/СССР/69
<i>ts/non-ca</i>	А/Брисбен/59/07 (Н1Н1) А/Филиппины/2/82 (Н3Н2) А/Иоганнесбург/33/94 (Н3Н2) А/Нанчанг/933/95 (Н3Н2) А/Брисбен/10/07 (Н3Н2) В/СССР/3/87 В/Петербург/92/95 В/Флорида/07/04
<i>non-ts/ca</i>	А/Пекин/262/95 (Н1Н1) А/Перт/13/95 (Н1Н1) А/Иоганнесбург/82/96 (Н1Н1) А/Панама/2007/99 (Н3Н2) В/Малайзия /06/04
<i>ts/ca</i>	В/Джилин/20/03 В/Техас/06/11

Приведенные данные позволяют предположить, что существует определенная цикличность (волнообразность) проявления *ts* признака вирусов гриппа А и В, что температурный диапазон репродукции меняется в ходе естественного дрейфа возбудителей гриппа А (Н1Н1, Н2Н2 и Н3Н2) и В линий «Виктория» и «Ямагата».

На протяжении ряда лет предшествовавших появлению нового пандемического вируса А/Калифорния/4/2009 (Н1Н1)_{pdm}, для вирусов гриппа сероподтипа А (Н1Н1) обозначилась устойчивая тенденция циркуляции штаммов, обладающих *ts* фенотипом. Эта тенденция отмечалась и у вирусов гриппа сероподтипа А (Н3Н2) и В, среди которых наблюдается вариабельность *ts* признака. Пандемия 2009 года открыла новый цикл циркуляции температуроустойчивых вирусов гриппа.

6.2 ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЗНАКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ВИРУСОВ ГРИППА В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Помимо интереса в познании эволюции признака, при подготовке реассортантов для ЖГВ фактор чувствительности/устойчивости к ингибиторам имеет прикладное практическое значение. В стандартную схему подготовки вакцинных штаммов входит использование гипериммунной сыворотки к донору аттенуации. Это обеспечивает селективное преимущество реассортантам, наследующим HA и NA от антигенно актуального эпидемического родителя. Селекция реассортантов с вакцинной формулой генома 6:2 на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов бывает осложнена неспецифическим связыванием HA эпидемического родителя ингибиторами сыворотки к донору аттенуации.

Для удаления неспецифических ингибиторов гипериммунные сыворотки, используемые для селекции вакцинных реассортантов, предварительно обрабатываются разрушающим рецепторы ферментом нейраминидазой (RDE, receptor destroying enzyme) и прогреваются при 56-60°C. Однако неспецифические термостойчивые ингибиторы полностью с помощью RDE и прогрева устранить не удастся [137, 383]. В связи с этим ингибиторостойчивая природа «дикого» родительского вируса гарантирует более быстрый и стабильный результат в процессе подготовки вакцинных штаммов.

Устойчивость/чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови рассматривается в работе как маркер, характеризующий рекомендуемый для включения в вакцину эпидемический вирус. Оценка роли этого биологического признака дает возможность индивидуально подбирать рациональную стратегию для успешного получения реассортантов с вакцинной формулой генома.

В то же время анализ связывания гликанов вирусами гриппа предоставляет информацию для отслеживания эволюции, тканевого тропизма и возможности трансмиссии, а также вносит вклад в надзор за циркулирующими вирусами и может способствовать выбору вакцинного штамма.

6.2.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А и В РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ ПО ПРИЗНАКУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫМ ИНГИБИТОРАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Мы провели ретроспективную оценку чувствительности к термостабильным ингибиторам эпидемических эталонных вирусов гриппа А и В со времени их интродукции к человеку и изолятов из разных эпидемий, с целью проследить пути вирусной эволюции и тропизма к

хозяину и опосредованно оценить рецепторные предпочтения культивируемых в РКЭ вирусов гриппа человека.

Мы также преследовали цель выявления среди социркулирующих штаммов одной антигенной разновидности, изолятов, отличающихся по чувствительности к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови, что может дать дополнительную информацию об эволюции признака.

Следует иметь в виду, что проявление устойчивости к неспецифическим ингибиторам вирусами человека, выделенными и культивируемыми в РКЭ, может быть артефактом перенастройки на рецепторы нового хозяина, поскольку адаптационные мутации способны проявиться уже в результате единственного пассажа [459]. Возможно, проведенный ретроспективный анализ, более всего оценивает пути адаптации различных штаммов вирусов человека к новому хозяину. Тем не менее, выявленные даже в таких условиях штаммовые и серотипические (родовые) различия характеризуют эволюционные различия и путь адаптации вирусов человека к РКЭ. Кроме того показано, что распознавание α -2,6 или α -2,3 связей у вирусов гриппа сероподтипов H1N1 и H3N2 может не полностью коррелировать с чувствительностью к ингибиторам сыворотки крови лошади [461, 484].

Все исследованные вирусы человека были получены из официальных источников для работы над ЖГВ, либо выделены из местных локальных вспышек. Они прошли ограниченное количество пассажей в РКЭ, и, соответственно пребывали в приблизительно равных условиях переадаптации. С учетом этого мы посчитали допустимым их сравнение по исследуемому признаку как оценку проявления эволюции.

В качестве источника ингибиторов использовали неиммунную сыворотку крови лошади, а в некоторых исследованиях сыворотку крови морской свинки.

Подбор режима температурной обработки неиммунной сыворотки крови. Для устранения температурочувствительных ингибиторов, которые могут экранировать картину взаимоотношений вирусов и температуроустойчивых ингибиторов, сыворотку лошади, разведенную 1:10 в PBS, прогревали при 56, 80 и 100°C. Вирусы гриппа А и В сравнивались в реакции РТГА по чувствительности к ингибиторам сыворотки, обработанной тремя способами. По данным, приведенным в таблице 6.9, прогревание при температуре 56°C не выявляет влияния термостабильных сывороточных ингибиторов на исследуемые вирусы. Прогретая при 100°C сыворотка, обладает высокой активностью термостабильных ингибиторов на чувствительные вирусы. При этом воздействия 80°C уже достаточно для проявления полноценного действия термостабильных ингибиторов в сыворотке.

Все дальнейшие исследования проведены с использованием неиммунной сыворотки крови лошади, прогретой от 80 до 100°C и не обработанной разрушающими лектины ферментами.

Таблица 6.9 - Активность неспецифических ингибиторов нормальной сыворотки крови лошади при разных вариантах ее температурной обработки

Вирус	Титр ингибирования вируса в РТГА при разных вариантах обработки сыворотки		
	56°С, 30 мин	80°С, 10 мин	100°С, 10 мин
В/Ямагата/16/88	< 10	160	160
В/Панама/45/90	< 10	640	640
В/Вашингтон/01/96	< 10	2560	2560
В/Аляска/01/96	< 10	2560	2560
В/Висконсин/03/96	< 10	5120	5120
В/Висконсин/05/96	< 10	2560	2560
В/Гонконг/330/01	< 10	20	20
В/Брисбен/60/80	< 10	20	20
А/Калифорния/07/2009(Н1N1)pdm	< 10	< 10	< 10
А/Малайзия/01/04 (Н3N2)	80	2560	2560

Все исследованные вирусы гриппа сероподтипа А(Н1N1) 1977 – 2009 годов выделения характеризовались устойчивым к ингибиторам фенотипом. Интересно, что вирус Н1N12009pdm, независимо от системы выделения из культуры клеток – А/Калифорния/04/2009, или из РКЭ – А/Калифорния/07/2009 был устойчив к сывороточным ингибиторам (табл. 6.10 и 7.2).

Среди небольшой группы исследованных вирусов сероподтипа А(Н2N2), выделенных в период с 1957 по 1967 гг. выявились различия по исследуемому признаку у представителей разных лет (табл. 6.10). В коллекции ИЭМ имеется два варианта возбудителя пандемии азиатского гриппа А/Сингапур/1/57 – чувствительный к макроглобулинам сыворотки лошади и ингибиторостойчивый. Это соответствует литературным данным, о том, что в 1957 году было выделено два варианта «Сингапурского» вируса А (Н2N2), устойчивый и чувствительный к ингибитору, содержащемуся в неиммунной лошадиной сыворотке [187]. Вирус А/Ленинград/134/57, антигенно родственный А/Сингапур/1/57 и выделенный в том же году, были ингибиторостойчивыми, как и исследованные штаммы 1959 и 1966 годов. В конце циркуляции вирусов «Сингапурского» периода был выделен ингибиторочувствительный штамм А/Токио/3/67.

Вирусы сероподтипа А(Н3N2), в отличие от *ir* вирусов А(Н1N1), значительно варьировали по чувствительности к термостабильным ингибиторам (табл.6.10 и 7.3). С 1968 по 2012 гг. циркулировали как *ir*, так и высоко *is* эпидемические варианты. Возбудитель пандемии А/Гонконг/1/68 (Н3N2) характеризовался ингибиторочувствительностью, как и его дрейфовый

вариант А/Англия/42/72. Среди 24 проанализированных штаммов сероподтипа H3N2 11 (~46%) оказались ингибитороустойчивыми.

Нами был также изучен по исследуемому признаку фенотип 52 вирусов гриппа В, включая филогенетически относящиеся к двум эволюционирующим ветвям и «ранние» вирусы 1940-70-х гг.

Анализ «ранних» вирусов, циркулировавших до расхождения на две ветви В/Виктория/2/87- и В/Ямагата/16/88-подобных, продемонстрировал их высокую устойчивость к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади (табл. 6.11 и В.5). Интересно, что дивергенция на две линии «Виктория» и «Ямагата» затронула как антигенные свойства, так и другие биологические характеристики, включая различия в чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови. Все изученные вирусы ветви «Ямагата» оказались ингибиторочувствительными. Среди 26 исследованных вирусов этой ветви слабо чувствительными (титр в РТГА 1:80) можно считать только вирус В/Яманаши/166/98. Ни одного устойчивого вируса не выявлено. Напротив, вирусы ветви «Виктория» выделенные с 1987 по 2013 гг. имели ингибитороустойчивый фенотип, лишь в эпидемический сезон 2011/2012 года среди «Викторианской» ветви впервые появились ингибиторочувствительные вирусы, представителем которых является вирус А/Невада/3/11, показавший титр в РТГА с нормальной сывороткой лошади 1:5120.

Несмотря на то, что штаммы «Викторианской» линии антигенно значительно отличались от вирусов предыдущих лет выделения [465], они сохранили присущий ранним вирусам признак устойчивости к ингибиторам. Вирусы же линии «Ямагата», сохраняя большее филогенетическое родство с «ранними» вирусами, оказались, в отличие от них, высоко ингибиторочувствительными.

6.2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННО РОДСТВЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА ИЗ ОДНОГО ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЕЗОНА ПО ПРИЗНАКУ ИНГИБИТОРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Для оценки однородности по признаку чувствительности к неспецифическим термостабильным ингибиторам антигенно родственных изолятов, выделенных в РКЭ в течение одного эпидемического сезона, были проанализированы вирусы гриппа А(H1N1), А(H3N2) и В.

Было исследовано 9 изолятов вирусов сероподтипа H1N1 из одной эпидемии 1998 года в одном регионе - Санкт-Петербурге - (табл. 6.12). Антигенный эталон этой эпидемии – вирус А/Пекин/262/95 (H1N1). Все изоляты оказались ингибитороустойчивыми, как и их эталонный представитель, и как все другие вирусы гриппа H1N1.

Таблица 6.10 - Чувствительность вирусов гриппа А неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади

Вирус		Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип ¹	Вирус	Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип ¹
H1N1	А/ХАБАРОВСК/1/77pdm ²	< 10	<i>ir</i>	А/ПЕКИН/262/95	<20	<i>ir</i>
	А/Одесса/1182/84	<20	<i>ir</i>	А/ИОГАННЕСБУРГ/82/96	<20	<i>ir</i>
	А/Свердловск/211/85	<20	<i>ir</i>	А/НОВАЯ КАЛЕДОНИЯ/20/99	<20	<i>ir</i>
	А/ТАЙВАНЬ/1/86	<20	<i>ir</i>	А/СОЛОМОНОВЫ ОСТРОВА/03/06	<20	<i>ir</i>
	А/Новошахтинск/3/86	<20	<i>ir</i>	А/Гонконг/2652/06	<20	<i>ir</i>
	А/Новошахтинск/8/86	<20	<i>ir</i>	А/Санкт-Петербург/08/06	<20	<i>ir</i>
	А/ТЕХАС/36/91	<20	<i>ir</i>	А/БРИСБЕН/59/07	<20	<i>ir</i>
	А/БЕРН/7/95	20	<i>ir</i>	А/КАЛИФОРНИЯ/07/2009pdm	< 10	<i>ir</i>
	А/ПЕРТ/13/95	<20	<i>ir</i>	А/КАЛИФОРНИЯ/04/2009pdm	< 10	<i>ir</i>
H2N2	А/СИНГАПУР/1/57 ³	<10	<i>ir</i>	А/Краснодар/101/59	<10	<i>ir</i>
	А/СИНГАПУР/1/57 ³	160	<i>is</i>	А/Калифорния/1/66	<10	<i>ir</i>
	А/Ленинград/134/57	<10	<i>ir</i>	А/Токио/3/67	160	<i>is</i>
H3N2	А/ГОНКОНГ/1/68	320	<i>is</i>	А/Гонконг/1186/03	<20	<i>ir</i>
	А/Англия/42/72	160	<i>is</i>	А/Малайзия/01/04	2560	<i>is</i>
	А/Днепропетровск/2918/87	<20	<i>ir</i>	А/КАЛИФОРНИЯ/07/04	20	<i>ir</i>
	А/Одесса/660/88	<20	<i>ir</i>	А/ВЕЛЛИНГТОН/01/04	160	<i>is</i>
	А/Москва/133/7/89	640	<i>is</i>	А/ВИСКОНСИН/67/05	20	<i>ir</i>
	А/Харьков/38/91	1280	<i>is</i>	А/БРИСБЕН/10/07	320	<i>is</i>
	А/Иоганнесбург/33/94	20	<i>ir</i>	А/ПЕРТ/16/09	80	<i>is</i>
	А/НАНЧАНГ/933/95	320	<i>is</i>	А/ВИКТОРИЯ/361/11	≤10	<i>ir</i>
	А/Ухань/595/95	320	<i>is</i>	А/ИНДИАНА/10/11 (H3N2)v	2560	<i>is</i>
	А/ПАНАМА/2007/99	160	<i>is</i>	А/Техас/50/12	40	<i>ir</i>
	А/СИДНЕЙ/5/97	320	<i>is</i>	А/Гавайи/22/12	≤10	<i>ir</i>
	А/ВАЙОМИНГ/3/03	<20	<i>ir</i>	А/Огайо/02/12	≤10	<i>ir</i>

В табл. 6.9-6.11: ¹Нормальная сыворотка крови лошади, прогрета в разведении 1:10 при 80°C 10 минут; использованы 1% человеческие эритроциты 0(I) Rh⁺. Вирусы считали ингибиторостойчивыми при титре сыворотки в РТГА ≤ 1:40 и ингибиторочувствительными при титре ≥ 1:80.

²Заглавными буквами обозначены эталонные вирусы. ³Два варианта вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2), выделенные в 1957 г. - *ir/is* [187].

Таблица 6.11 - Чувствительность вирусов гриппа В к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади

Дивергент- ная линия	Вирус гриппа	Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип	Вирус гриппа	Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип
«ранние»	В/LEE/40	< 10	<i>ir</i>	В/ Гонконг /08/73	20	<i>ir</i>
	В/Ленинград/14/55	< 10	<i>ir</i>	В/Ленинград/693/83	20	<i>ir</i>
	В/Ленинград/95/59	< 10	<i>ir</i>	В/Техас/1/84	10	<i>ir</i>
	В/Энн Арбор/1/66	10	<i>ir</i>	В/Киев/2186/85	20	<i>ir</i>
	В/Душанбе/62/66	10	<i>ir</i>	В/ЭНН АРБОР/1/86	20	<i>ir</i>
	В/Россия /69	20	<i>ir</i>	В/Энн Арбор/2/86	20	<i>ir</i>
	В/СССР/69	10	<i>ir</i>	В/Рига/3968/86	10	<i>ir</i>
«Виктория»	В/ВИКТОРИЯ/02/87	40	<i>ir</i>	В/Тегеран/80/02	20	<i>ir</i>
	В/СССР/3/87	40	<i>ir</i>	В/МАЛАЙЗИЯ/2506/04	20	<i>ir</i>
	В/ШАНДОНГ/07/97	40	<i>ir</i>	В/Огайо/01/05	20	<i>ir</i>
	В/Токио/53/99	40	<i>ir</i>	В/БРИСБЕН/60/08	<20	<i>ir</i>
	В/ГОНКОНГ/330/01	20	<i>ir</i>	В/Техас/26/08	<20	<i>ir</i>
	В/Гавай/10/01	40	<i>ir</i>	В/Невада/03/11	5120	<i>is</i>
«Ямагата»	В/ЯМАГАТА/16/88	160	<i>is</i>	В/ Оклэнд /01/00	2560	<i>is</i>
	В/Пекин/203/89	160	<i>is</i>	В/ГУАНДОНГ/120/00	640	<i>is</i>
	В/ПАНАМА/45/90	640	<i>is</i>	В/Улан-Уде/3/01	320	<i>is</i>
	В/ПЕКИН/184/93	640	<i>is</i>	В/Виктория/504/01	320	<i>is</i>
	В/ХАРБИН/07/94	160	<i>is</i>	В/ШАНХАЙ/361/02	320	<i>is</i>
	В/Петербург/92/95	320	<i>is</i>	В/ДЖИЛИН/20/03	320	<i>is</i>
	В/ФЛОРИДА/02/96	1280	<i>is</i>	В/Янгсу/10/03	640	<i>is</i>
	В/ЯМАНАШИ/166/98	80	<i>is</i>	В/Флорида/07/04	320	<i>is</i>
	В/СИЧУАНЬ/379/99	160	<i>is</i>	В/ ФЛОРИДА /04/06	2560	<i>is</i>
	В/Токио/53/99	320	<i>is</i>	В/Брисбен/3/07	2560	<i>is</i>
	В/Архангельск/312/99	2560	<i>is</i>	В/ВИСКОНСИН/1/10	640	<i>is</i>
	В/ИОГАННЕСБУРГ/05/99	320	<i>is</i>	В/Бангладеш/1994/10	2560	<i>is</i>
	В/Шанхай/72/99	320	<i>is</i>	В/Техас/6/11	2560	<i>is</i>

Таблица 6.12 - Чувствительность к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади антигенно родственных изолятов вирусов гриппа А и В из отдельных эпидемий

Эталонный штамм/изолят	Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип	Эталонный штамм/изолят	Титр ингибирования вируса в РТГА	<i>ir/is</i> фенотип
В/ПЕКИН/184/93	640	<i>is</i>	А/ПЕКИН/262/95 (H1N1)	<20	<i>ir</i>
В/Айова/03/95	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/14/98	40	<i>ir</i>
В/Южная Дакота/04/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/35/98	<20	<i>ir</i>
В/Техас/11/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/73/98	<20	<i>ir</i>
В/Аляска/01/96	2560	<i>is</i>	А/С-Петербург/77/98	40	<i>ir</i>
В/Теннеси/01/96	2560	<i>is</i>	А/С-Петербург/89/98	<20	<i>ir</i>
В/Луизиана/01/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/92/98	<20	<i>ir</i>
В/Флорида/02/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/100/98	20	<i>ir</i>
В/Пенсильвания/02/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/101/98	40	<i>ir</i>
В/Вашингтон/01/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/103/98	<20	<i>ir</i>
В/Висконсин/02/96	5120	<i>is</i>			
В/Висконсин/03/96	5120	<i>is</i>	А/СИДНЕЙ/5/97 (H3N2)	320	<i>is</i>
В/Висконсин/04/96	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/120/00	20	<i>ir</i>
В/Висконсин/05/96	2560	<i>is</i>	А/С-Петербург/127/00	20	<i>ir</i>
В/Нью Йорк/01/96	640	<i>is</i>	А/С-Петербург/128/00	20	<i>ir</i>
В/С-Петербург/184/95	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/147/00	<20	<i>ir</i>
В/С-Петербург/185/95	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/164/00	<20	<i>ir</i>
В/С-Петербург/198/95	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/181/00	<20	<i>ir</i>
В/С-Петербург/202/95	1280	<i>is</i>	А/С-Петербург/186/00	<20	<i>ir</i>
В/С-Петербург/206/95	1280	<i>is</i>			
В/С-Петербург/209/95	1280	<i>is</i>			
В/С-Петербург/221/95	1280	<i>is</i>			

Группа, включающая 7 изолятов сероподтипа А(Н3N2) из эпидемии 2000 года в Санкт-Петербурге, также была однородна в своей устойчивости к ингибиторам, однако отличалась по этому признаку от эталона эпидемии, выделенного в тремя годами ранее, ингибиторочувствительного вируса А/Сидней/5/97 (табл.6.12).

Все 7 изолятов вируса гриппа В из эпидемии 1995-1996 в Санкт-Петербурге были высокочувствительны к термостабильным ингибиторам, как и их эталон – вирус В/Пекин/184/93, и не отличались по этому признаку от других представителей линии «Ямагата»-подобных вирусов. Похожие данные получены при анализе 14 штаммов, выделенных в ту же эпидемию в США. Все проанализированные вирусы этой эпидемии, как выделенные из территориально отдаленных мест, включая Аляску, так и из одного штата Висконсин, были высокочувствительны к сывороточным ингибиторам, не отличаясь от своего эталонного представителя. (табл. 6.12).

Эти данные дают основания принять отсутствие индивидуальных эволюционных и адаптационных к РКЭ особенностей среди антигенно родственных штаммов вирусов гриппа А и В.

6.2.3 ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА, ИМЕЮЩИХ ВОЗМОЖНУЮ СВЯЗЬ С ПРИЗНАКОМ ИНГИБИТОРОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА В

Для выявления возможных молекулярных детерминант чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади, были проанализированы уникальные аминокислотные замены в HA1 вирусов гриппа В.

Две антигенно и генетически различающиеся ветви вирусов гриппа В четко различаются по своей чувствительности к термостабильным неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади. 52 вируса гриппа В были фенотипически охарактеризованы в РТГА по чувствительности к неспецифическим сывороточным ингибиторам (табл. 6.11). Из этих штаммов для молекулярной характеристики отобраны 22 вируса, включая 12 вирусов ветви «Ямагата», 6 - ветви «Виктория» и 4 «ранних».

Аминокислотные последовательности HA1 этих вирусов, полученные из международных баз данных [8, 9], были выровнены с помощью компьютерной программы Clone Manager 9 for Windows.

У ингибиторочувствительных вирусов линии «Ямагата» в последовательности HA1 нами были зафиксированы 9 уникальных замен в сравнении с ингибиторорезистентными «ранними» и «Викторианскими» вирусами: Lys-86-Met, Ile-91-Thr, Asn-163-Ser, Gly-164-Arg/Lys, Asn-178-Asp, Glu-213-Lys, Ala/Val-217-Lys, Lys-218-Asn, Lys-224-Asn (табл.6.13).

Для выявления замен, имеющих возможную корреляцию с проявлением признака ингибиторочувствительности вирусами ветви «Ямагата», было проведено выравнивание 68 аминокислотных последовательностей HA1 вирусов разных эволюционных ветвей по выбранным ранее позициям, взятых из баз данных (табл. В.11-В.13 Приложения). При этом учитывалась выявленная закономерность – ингибитороустойчивость «ранних» и «Виктория»-подобных вирусов гриппа В и чувствительность «Ямагата»-подобных вирусов. По результатам сравнения часть из перечисленных выше аминокислотных позиций была исключена, как не имеющая отношения к *ir*-фенотипу вирусов. Например: у В/Ямагата/16/88-подобного вируса В/Mie/01/93 в позиции 151 был обнаружен такой же аминокислотный остаток (Lys) как и у большинства В/Виктория/02/87-подобных вирусов; участок 177-182 полностью совпадает у вируса В/England/222/1982, выделенного до разделения на ветви, и у вируса В/Houston/02/1993, относящегося к В/Ямагата/16/88-подобным вирусам; в позиции 213 у вирусов В/Osaka/1970 и В/USSR/100/1983, выделенных до середины 80-х годов, находится аминокислотный остаток Lys, как и вирусов ветви «Ямагата».

В результате определены 3 уникальные мутации в молекуле HA1, присущие всем ингибиторочувствительным вирусам: Lys-86-Met; Asn-163-Ser, Lys-224-Asn

Локализация этих мутаций показана на модели, построенной на основе рентгеноструктурного анализа гемагглютиниона вируса гриппа В [544] (рис. 6.5).

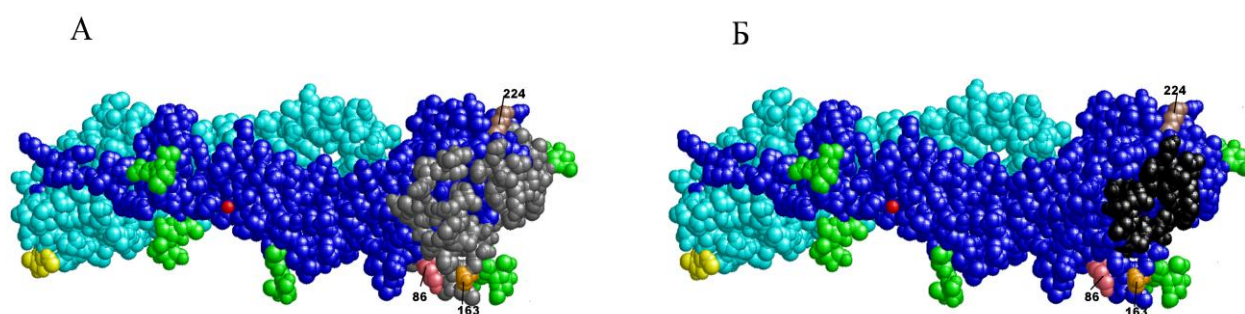


Рисунок 6.5 – Аминокислотные позиции в белке HA, соответствующие проявлению признака ингибиторочувствительности у вирусов гриппа В.

(А, Б) синим цветом показана цепь HA1, голубым – цепь HA2, остатки в местах гликозилирования показаны зеленым, желтым (NAG) и красным (SO₄);

(А) серым цветом отмечены антигенные регионы;

(Б) черным цветом отмечен рецепторсвязывающий сайт (RBS);

(А, Б) розовым, оранжевым и коричневым цветом отмечены 86, 163 и 224 аминокислотные остатки, соответственно.

Таблица 6.13 - Аминокислотные замены в гемагглютинине исследованных фенотипически дивергентных линий вирусов гриппа В

Вирус	ID номер НА в базе данных	дивергентная линия	Титр в РТГА*	Позиция аминокислоты								
				86	91	163	164	178	213	217	218	224
В/Ли/40	NC_002207	«ранний»	10	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Ile	Lys
В/Россия/69	AB027387	«ранний»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Ile	Lys
В/Гонконг/8/73	K00425	«ранний»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Lys	Lys
В/ЭнАрбор/1/86	DQ508913	«ранний»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Lys	Lys
В/Виктория/2/87	CY018757	«Виктория»	40	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Lys	Lys
В/Шангдонг/7/97	AF486836	«Виктория»	40	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys
В/Гавай/10/01	CY019507	«Виктория»	40	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys
В/Гонконг/330/01	AY504610	«Виктория»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys
В/Тегеран/80/02	AJ784042	«Виктория»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys
В/Малайзия/2506/04	ISDN231265	«Виктория»	20	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys
В/Ямагата/16/88	CY018765	«Ямагата»	160	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Панама/45/90	CY018349	«Ямагата»	640	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Пекин/184/93	AF050061	«Ямагата»	80-320	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Харбин/7/94	AF050065	«Ямагата»	160	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Яманаша/166/98	CY019531	«Ямагата»	80	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Иоганнесбург/05/99	CY018613	«Ямагата»	160	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Сичуань/379/99	AF319590	«Ямагата»	160	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Окленд/01/00	CY018413	«Ямагата»	2560	Met	Thr	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Мехико/84/00	CY018445	«Ямагата»	160	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Шанхай/361/02	AJ784056	«Ямагата»	320	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Джилин/20/03	NCBI: ACF54180	«Ямагата»	320	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn
В/Флорида/07/04	ISDN110496	«Ямагата»	320	Met	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Lys	Asn	Asn

*обратная величина титра ингибирования вируса в РТГА с неиммунной сывороткой крови лошади.

Все выявленные аминокислотные замены находятся вблизи антигенного сайта: аминокислотные остатки 86 и 224 расположены в непосредственной близости от антигенного сайта HA, а 163 остаток находится в 160 петле. Ни одна из выявленных аминокислотных замен не затрагивает напрямую RBS, но все они находятся недалеко от него. Аминокислотная замена в позиции 163, как возможная детерминанты рецепторной специфичности, описана также в работе Wang et al. [546]. Консервативная позиция Asn-163 у всех вирусов «Викторианской» ветви является сайтом гликозилирования, она утрачена вирусами ветви «Ямагата» вследствие делеции.

6.3 РОЛЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ В ПРОЯВЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА К НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ

В наших исследованиях, при получении штаммов ЖГВ с формулой генома 6:2, *is/ir* фенотип наследовался реассортантными вирусами с генами, кодирующим гликопротеины HA и NA эпидемического родителя (табл. 7.2-7.4), что соответствует представлениям о связи исследуемого признака с рецепторной специфичностью гемагглютинина, но не исключает возможное дополнительное участие нейраминидазы в проявлении *is/ir* фенотипа. Известно, что между HA и NA существует функциональный баланс [540]. Этот баланс проявляется в единстве противоположности их функций. HA вирусов гриппа отвечает за прикрепление к остатку сиаловой кислоты в составе сиалилолигосахаридов на поверхности клетки, обеспечивая инициацию инфекции, а фермент NA (сиалидаза), отщепляет сиаловую кислоту из сиалилолигосахаридов при созревании вирионов, обеспечивая освобождение почкующегося вирусного потомства с поверхности инфицированной клетки, чем способствует распространению инфекции. Показано также, что при искусственном подавлении функции нейраминидазы гемагглютинин ингибитороустойчивых вирусов гриппа A(H3N2) терял способность освобождаться от ингибитора и вирусы становились ингибиторочувствительными [245].

Для того чтобы оценить возможную индивидуальную роль белков HA и NA в наследовании реассортантными вирусами гриппа чувствительности к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови, мы сравнили чувствительность к сывороточным ингибиторам реассортантов с формулой генома 6:2 и 7:1 и их родительских вирусов. В исследовании были использованы реассортанты, полученные на основе устойчивых к сывороточным ингибиторам доноров аттенуации A17 и B60 и отличающихся по чувствительности к ингибиторам эпидемических вирусов гриппа A и B. В этом разделе работы использовалась неиммунная сыворотка крови морской свинки, обладающая сходными

характеристиками с сывороткой крови лошади. Была проведена оценка чувствительности к неспецифическим ингибиторам 6:2 и 7:1 реассортантов на основе 6 *is* и 3 *ir* «диких» вирусов гриппа А и В.

При скрещивании доноров *att* с устойчивыми к ингибиторам эпидемическими вирусами гриппа А и В все реассортанты, независимо от формулы генома 6:2 или 7:1, характеризовались равной с родительскими вирусами устойчивостью к ингибиторам. Однако, степень ингибиторочувствительности реассортантных вирусов с формулой генома 6:2 и 7:1 существенно отличалась, если в качестве источника поверхностных антигенов использовали *is* «дикий» вирус (табл. 6.14). В РТГА отмечено 8-16-кратное (3-4 \lg_2 СГТ) снижение титра с сывороткой морской свинки у всех 7:1 реассортантов, унаследовавших НА от *is* родителя, а NA – от *ir* донора аттенуации, по сравнению с аналогичными 6:2 реассортантами и/или родительскими вирусами ($t = 11.09$; $p < 0,0001$).

Установленный факт свидетельствует в пользу представления о комплексном участии белков НА и NA во взаимодействии с неспецифическими ингибиторами и о вкладе нейраминидазы в проявление ингибитороустойчивого фенотипа вирусов гриппа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенный анализ чувствительности к термостабильным ингибиторам сыворотки крови эпидемических вирусов гриппа А и В, выделенных с 1934 по 2012 гг., позволил сделать некоторые обобщения о циркуляции *is* и *ir* штаммов вирусов гриппа. Все вирусы гриппа А(Н1N1) устойчивы к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади и морской свинки. Вирусы гриппа А(Н2N2) и (Н3N2) варибельны по признаку ингибиторочувствительности. У вирусов Н3N2 изменения чувствительности к ингибиторам отмечены при ретроспективном наблюдении и при сравнении идентичных по антигенным свойствам и *ir* фенотипу изолятов 2000 года с их *is* прототипом, выделенным в 1997 году. И особенно наглядно проявилась у вирусов гриппа В.

Эволюция вирусов гриппа В, результатом которой стало появление двух ветвей «Ямагата»- и «Виктория»-подобных вирусов, привела к их разделению по признаку чувствительности к термостабильным сывороточным ингибиторам.

Неоднородности по признаку чувствительности к ингибиторам у социркулирующих вирусов гриппа А (Н1N1), А (Н3N2) и В не выявлено.

Если правомочно признавать чувствительность вирусов к неспецифическим сывороточным ингибиторам сыворотки крови лошади (морской свинки) отражением изменений рецепторной специфичности НА, то следует отметить, что рецепторная специфичность

Таблица 6.14 - Чувствительность родительских вирусов гриппа и реассортантов к неиммунной сыворотке крови морской свинки в реакции торможения гемагглютинации

Вирус		Происхождение гена			Титр РТГА	Чувствительность к ингибиторам
Код	Название штамма	Тип (Подтип)	HA	NA		
<i>Вирусы гриппа А</i>						
A17	А/Ленинград/135/17/57	H2N2	A17	A17	< 10	Устойчивый ³
WT ¹	А/Калифорния/07/04	H3N2	WT	WT	2560	Чувствительный ⁴
R1 ²	А/Калифорния /07/04 × A17	H3N2	WT	A17	320	Чувствительный (<) ⁶
R2	А/Калифорния /07/04 × A17	H3N2	WT	WT	2560	Чувствительный (=) ⁵
WT	NIBRG-23	H5N1	WT	WT	5120	Чувствительный
R3	NIBRG-23 × A17	H5N2	WT	A17	640	Чувствительный (<)
R4	NIBRG-23 × A17	H5N2	WT	A17	640	Чувствительный (<)
R5	NIBRG-23 × A17	H5N2	WT	A17	640	Чувствительный (<)
WT	INDO/05	H5N1	WT	WT	10	Устойчивый
R6	INDO/05 × A17	H5N2	WT	A17	10	Устойчивый (=)
R7	INDO/05 × A17	H5N2	WT	A17	10	Устойчивый (=)
WT	VN-PR	H5N1	WT	WT	< 10	Устойчивый
R8	VN-PR × A17	H5N2	WT	A17	< 10	Устойчивый (=)
R9	VN-PR × A17	H5N2	WT	A17	< 10	Устойчивый (=)
R10 ⁵	А/VN/1203/2004 × A17	H5N1	WT	WT	< 10	Устойчивый (=)
<i>Вирусы гриппа В</i>						
B60	В/СССР/60/69	В	B60	B60	< 10	Устойчивый
WT	В/Харбин/07/94	В	WT	WT	10240	Чувствительный
R11	В/ Харбин /07/94 × B60	В	WT	B60	2560	Чувствительный (<)
WT	В/Техас/26/08	В	WT	WT	< 10	Устойчивый
R12	В/Техас/26/08 × B60	В	WT	B60	< 10	Устойчивый (=)
R13	В/Техас/26/08 × B60	В	WT	WT	< 10	Устойчивый (=)
WT	В/Висконсин/1/10	В	WT	WT	5120	Чувствительный
R14	В/Висконсин/1/10 × B60	В	WT	B60	320	Чувствительный (<)
R15	В/Висконсин/1/10 × B60	В	WT	WT	5120	Чувствительный (=)
R16	В/Висконсин/1/10 × B60	В	WT	WT	5120	Чувствительный (=)
WT	В/Бангладеш/1994/10	В	WT	WT	5120	Чувствительный
R17	В/Бангладеш/1994/10 × B60	В	WT	B60	640	Чувствительный (<)
WT	В/Техас/06/11	В	WT	WT	640	Чувствительный
R18	В/Техас/06/11 × B60	В	WT	B60	80	Чувствительный (<)
R19	В/Техас/06/11 × B60	В	WT	WT	640	Чувствительный (=)

¹Эпидемический вирус (либо реассортант на основе PR8 с HA и NA от соответствующего дикого вируса). ²Реассортанты «дикого» вируса с донором аттенуации; реассортанты, унаследовавшие HA от «дикого» вируса, а NA от «дикого» вируса (формула генома 6:2) или от донора аттенуации (формула генома 7:1). ³Вирус, устойчивый к термостабильным неспецифическим ингибиторам сыворотки. ⁴Вирус, чувствительный к термостабильным неспецифическим ингибиторам сыворотки. ⁵6:2 реассортант R10 (A/17/VN/1203/04-RG) ⁶Чувствительность реассортантного вируса к температуростабильным неспецифическим ингибиторам сыворотки в сравнении с «диким» родительским вирусам; p < 0.0001).

вирусов, в первую очередь продолжающих циркуляцию вирусов H3N2, подвержена эволюционной изменчивости. Однако, для однозначного вывода следует исключить влияние лабораторных артефактов при культивировании вирусов в РКЭ.

Замена в составе вириона NA ингибиторочувствительного эпидемического вируса на NA ингибитороустойчивого донора аттенуации значительно снижает чувствительность реассортантов к термостабильным сывороточным ингибиторам, что свидетельствует о функциональном взаимодействии NA с HA в проявлении исследуемого признака. По-видимому, нейраминидаза *ir* вирусов обладает более высокой ферментативной активностью, что способствует успеху в отщеплении *is* гемагглютининов при взаимодействии с лектинами сыворотки крови.

ГЛАВА 7 РЕАССОРТАНТНЫЕ ШТАММЫ ДЛЯ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН К СОВРЕМЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА

Согласно приказам № 150/40 Минздрава СССР и № 156/29 Минздрава РФ «О подготовке новых вакцинных производственных и диагностических штаммов вируса гриппа и их внедрении в производство вакцинных и диагностических препаратов» [114, 115], подготовку вакцинных штаммов для ЖГВ в России осуществляет отдел вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ».

С 1995 года автором было подготовлено, запатентовано и передано в производство девятнадцать холодоадаптированных реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, включая вакцинные штаммы к пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)pdm2009, к сезонным вирусам гриппа А (Н1N1) – два штамма, А (Н3N2) – восемь штаммов, к вирусам гриппа В – восемь штаммов. Помимо этого, подготовлены экспериментальные вакцинные штаммы к потенциально-пандемическим высокопатогенным вирусам гриппа птиц А (Н5N1) и вирусу гриппа свиней А (Н3N2)v.

Выпуск производственных серий ЖГВ на основе вакцинных реассортантов осуществлялся Иркутским Федеральным государственным унитарным предприятием по производству иммунобиологических препаратов НПО «Микроген». За период 1995-2015 годов были выпущены варианты живой гриппозной трехвалентной вакцины, подготовленной из перечисленных в таблице 7.1 штаммов.

В настоящей главе рассматриваются особенности подготовки штаммов живой гриппозной аттенуированной реассортантной вакцины на основе сезонных эпидемических, пандемического и потенциально-пандемических вирусов гриппа.

ГЛАВА 7.1 ПРИНЦИПЫ ПОДГОТОВКИ И ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А И В

Принципы подготовки. Подготовку вакцинных реассортантов на основе клонированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) и В/СССР/60/69/525 и рекомендованных ВОЗ актуальных эпидемических вирусов гриппа проводили методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах, описанном в главе 2 и представленном на схеме 2.1.

Таблица 7.1 - Реассортантные вакцинные штаммы, подготовленные для сезонных, пандемической и потенциально пандемических аттенуированных ЖГВ с 1995 по 2015 гг.

Штамм ЖГВ	Сероподтип/ линия	Родительские вирусы		Применялся в эпидсезоны, гг.
		донор <i>att</i>	эпидемический вирус	
<i>Вакцинные штаммы, переданные в производство</i>				
A/17/Иоганнесбург/94/1	H3N2	A17	A/Иоганнесбург/33/94	1995-1996
A/17/Нанчанг/95/4	H3N2	A17	A/Нанчанг/933/95	1996-1998
A/47/Нанчанг/95/13 ¹	H3N2	A47	A/Нанчанг/933/95	1996-1998
B/60/Петербург/95/20	«Ямагата»	B60	B/Петербург/92/95	1997-2001
B/60/Иоганнесбург/99/50	«Ямагата»	B60	B/Иоганнесбург/05/99	2001-2002
A/17/Вайоминг/03/8	H3N2	A17	A/Вайоминг/3/03	2004-2005
B/60/Джилин/03/1	«Ямагата»	B60	B/Джилин/20/03	2004-2006
B/60/Малайзия/04/898	«Виктория»	B60	B/Малайзия /2506/04	2006-2008
B/60/Флорида/04/181	«Ямагата»	B60	B/Флорида/07/04	2008-2009
A/17/Соломоновы острова/06/9	H1N1	A17	A/Соломоновы острова/03/06	2007-2008
A/17/Брисбен/07/28	H1N1	A17	A/Брисбен/59/07	2008-2010
A/17/Брисбен/07/1	H3N2	A17	A/Брисбен/10/07	2008-2010
B/60/Брисбен/08/83	«Виктория»	B60	B/Брисбен/60/08	2009-2011
A/17/Калифорния/09/38	H1N1pdm	A17	A/Калифорния/07/09	2009-2015
B/60/Висконсин/10/125	«Ямагата»	B60	B/Висконсин/1/10	2012-2013
A/17/Виктория/11/89	H3N2	A17	A/Виктория/361/11	2012-2013
A/17/Техас/12/30	H3N2	A17	A/Техас/50/12	2013-2015
B/60/Массачусетс/12/10	«Ямагата»	B60	B/Массачусетс/2/12	2013-2015
B/60/Пхукет/2013/26	Ямагата	B60	B/Пхукет/3073/2013	2015-2016
<i>Резервные вакцинные штаммы к потенциально пандемическим вирусам гриппа</i>				
A/17/Вьетнам/04/65107	H5N2	A17	VN-PR (H5N1)	прошел доклинические испытания
A/17/индюк/Турция/05/133	H5N2	A17	NIBRG-23 (H5N1)	прошел клинические испытания
A/17/Индонезия/05/4241	H5N2	A17	INDO-PR (H5N1)	резерв
A/17/Индиана/11/72	H3N2v	A17	A/Индиана/10/11	резерв

¹Вакцинный штамм для детей. До 2004 г. штаммы ЖГВ для детей готовились на доноре аттенуации A/Ленинград/134/47/57 (H2N2) (A47), прошедшем 30 дополнительных пассажей при 25°C [5].

При получении штаммов для живой гриппозной аттенуированной реассортантной вакцины (ЖГВ) создаются условия, обеспечивающие селекцию реассортантов с заданными свойствами. Реассортанты должны иметь формулу генома 6:2, т.е. наследовать два белка оболочки (НА, NA) – основные антигены вируса – от эпидемически актуального родителя, а 6 внутренних генов, обеспечивающих аттенуированный фенотип, от донора аттенуации.

Доклиническая характеристика. Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины должны удовлетворять ряду требований [127]. Прежде всего, они должны наследовать от

доноров аттенуации такие важные биологические свойства, как температурочувствительность и холодоустойчивость репродукции и апатогенность для лабораторных животных.

Sa фенотип приобретен донорами аттенуации в результате переадаптации «дикого» предшественника к репродукции при температуре 25-26°C в РКЭ. Пассирование при пониженной температуре привело к смещению температурного диапазона репродукции доноров аттенуации и выработке у них температурочувствительности, которая обуславливает аттенуацию донора и вакцинных реассортантов на их основе [323]. *Ts/ca* фенотип реассортанта является биологическим маркером, подтверждающим наследование генов донора, ответственных за аттенуацию.

Антигенная актуальность вакцинного реассортанта должна наследоваться вместе с генами НА и NA эпидемического родителя. Реассортантные штаммы ЖГВ обеспечивают выработку иммунного ответа у привитых лиц к актуальному эпидемическому вирусу и при этом являются безвредными для человека.

Первичный отбор потенциальных вакцинных клонов проводится по следующим критериям:

- (1) соответствие гемагглютинина эпидемическому родителю в РТГА;
- (2) соответствие по *ts/ca* фенотипу в РКЭ донору аттенуации.

Реассортанты, успешно прошедшие отбор по тестам (1) и (2), исследуются дальше:

- (3) проводится анализ состава генома на соответствие вакцинной формуле 6:2;
- (4) осуществляется полное секвенирование генома 6:2 реассортанта для подтверждения сохранности аттенуирующих мутаций и отсутствия таких приобретенных мутаций, которые могут повлиять на антигенные характеристики кандидата в вакцину и на его рецепторные взаимодействия с клеткой;
- (5) проверяется генетическая стабильность аттенуирующих мутаций после пяти пассажей в РКЭ. Пять пассажей приняты за стандарт при проверке генетической стабильности, поскольку в производственном процессе вакцинные штаммы, по утвержденному технологическому процессу, не подвергаются пассированию более трех-четырёх раз;
- (6) проводится оценка безвредности вакцинных штаммов для лабораторных животных.

7.1.1 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К СЕЗОННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Постоянство фенотипических и генетических признаков вакцинных штаммов продемонстрировано на примере подготовленных автором реассортантных вакцинных штаммов.

7.1.1.1 Антигенная характеристика вакцинного штамма. По антигенной характеристике, определяемой в РТГА, все вакцинные штаммы идентичны соответствующему родительскому эпидемическому вирусу. Второй антиген вируса гриппа – нейраминидаза идентичен эпидемическому родителю, что определяется молекулярно-генетическим анализом реассортантов.

*7.1.1.2 Маркеры аттенуации реассортантных вакцинных штаммов (*ts* и *ca* фенотип) в РКЭ.* В таблицах 7.2, 7.3 и 7.4 представлены результаты изучения биологических свойств эпидемических родительских вирусов А(Н1N1), А(Н3N2) и В, доноров аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе. Вакцинные штаммы характеризовали по соответствию их ростовых характеристик при повышенной и пониженной температурах инкубации в РКЭ донорам аттенуации.

Исследованные характеристики «диких» вирусов, демонстрируют, насколько неоднородны их биологические свойства. Лишь незначительное количество эталонных вирусов, которые выбирались кандидатами в вакцины с 1994 года по настоящее время, обладает типичными характеристиками высоковирулентных штаммов: способностью к репродукции при 40°C (38°C для вирусов гриппа В) – температуре нижних отделов респираторного тракта человека, и слабой репродуктивной активностью при пониженной температуре (*non-ts/non-ca* фенотип).

Среди современных эталонных вирусов, на основе которых получены вакцинные штаммы, такие характеристики демонстрируют возбудитель пандемии 2009 года А/Калифорния/07/09 (Н1N1)pdm, А/Виктория/361/2011 (Н3N2) и вирус гриппа свиней А/Индиана/10/11 (Н3N2)v. Вирусы А/Соломоновы острова/03/06 (Н1N1) и А/Гонконг/2652/06 (Н1N1), хотя и проявляют *ts* фенотип при 40°C, однако при 39°C их легко дифференцировать с донором А17, поскольку они при этой температуре сохраняют устойчивость репродукции.

Что касается современных эталонных вирусов гриппа В, то при 38°C все они проявляют *ts* фенотип, более того, для большинства 37°C является верхней ограничительной температурой репродукции.

Следует заметить, что для донора В60/525 *ts* фенотип при 38°C уже является показателем его аттенуации, а к температуре 37°C донор аттенуации устойчив больше, чем

современные эпидемические вирусы ($RCT_{37}=1,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$). Донор аттенуации получен из эпидемического вируса, который был выделен в период циркуляции высокотемператууроустойчивых штаммов. В такой ситуации маркером наследования реассортантами генов, кодирующих внутренние белки от донора В60/525, как это ни парадоксально, может являться большая температуроустойчивость при 37°C по сравнению с «диким» температурочувствительным родителем.

Некоторые вирусы, помимо температурочувствительности, характеризуются способностью к достаточно активной репродукции при 25°C, например штамм В/Техас/06/11, который считался потенциальным кандидатом в эталонные вирусы в 2012 году, и поэтому был использован нами для получения вакцинного реассортанта. При неэффективности работы такого селективного фактора, как пониженная температура инкубации, попытки получить 6:2 реассортант оказались затруднительными. Кроме того, вирус характеризовался ингибиторочувствительностью, что снижает эффективность второго селективного фактора – гипериммунной сыворотки против донора аттенуации. Возможно, из-за таких биологических особенностей (табл. 7.4) В/Техас/06/11 так и не приобрел эпидемического значения. Эталонном эпидемического сезона 2012/2013 гг. стал вирус В/Висконсин/1/10, тоже температуро- и ингибиторочувствительный, но обладающий, по крайней мере, одним из необходимых для успешной реассортации селективных признаков – *non-ca* фенотипом, к нему вакцинный штамм был получен.

Еще одним примером холодоустойчивости ($RCT_{25}= 2,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$) является эталонный вирус В/Малайзия/06/04, который при этом характеризовался *non-ts37°/ts38°* фенотипом. Вакцинный реассортант к этому вирусу был успешно получен благодаря эффективной работе сыворотки против донора аттенуации, чему способствовал ингибитороустойчивый фенотип «дикого» вируса.

Независимо от температурных характеристик «диких» вирусов, все вакцинные реассортанты являются температурочувствительным (*ts* фенотип), и холодоадаптированными (*ca* фенотип), как и доноры аттенуации, использованные в скрещивании, что свидетельствует о безвредности вакцинных вирусов для человека (табл. 7.2, 7.3, 7.4). Уровень репродукции в РКЭ всех *ca* реассортантных вакцинных штаммов при 25°C, как и доноров аттенуации А17 и В60/525, никогда не был ниже 5,0 $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ ($RCT_{25} = 2,0-3,0 \lg \text{ЭИД}_{50}$).

Таблица 7.2. - Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1), донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе

Вирусы	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t (°C)				RCT ₄₀ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	RCT ₂₅	Фенотип при t(°C)			Чувствительность к термостабильным ингибиторам	
	33°	39°	40°	25°			39°	40°	25°		
<i>Эпидемические вирусы А (H1N1)</i>											
А/Соломоновы острова/03/06	9,2	6,7	≤1,2 ¹	4,2	>8,0	5,0	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>	<i>ir</i>	<10 ²
А/Гонконг/2652/06	9,3	6,5	≤1,2	3,5	>8,1	5,8	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>	<i>ir</i>	<10
А/Брисбен/59/07	9,7	1,7	≤1,2	3,7	>8,5	6,0	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>non-ca</i>	<i>ir</i>	<10
А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm	8,7	8,7	7,9	2,7	0,8	6,0	<i>non-ts</i>	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>	<i>ir</i>	<10
<i>Реассортантные вакцинные штаммы</i>											
А/17/Соломоновы острова/06/9	9,2	1,7	1,0	7,2	8,2	2,0	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i>	<10
А/17/Гонконг/06/5977 ³	9,7	≤1,2	≤1,2	6,2	>8,5	2,5	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i>	<10
А/17/Брисбен/07/28	9,2	2,2	1,7	7,2	7,5	2,0	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i>	<10
А/17/Калифорния/09/38	8,2	2,2	2,5	7,0	5,7	1,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i>	<10
<i>Донор аттенуации</i>											
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	9,2	1,7	1,2	6,7	8,0	2,5	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i>	<10

Примечания: ¹Нижний порог чувствительности использованного метода.

²Обратная величина титра ингибирования гемагглютинации вируса нормальной сывороткой крови лошади, прогретой 10 мин при 80°C в РТГА. Вирус считался устойчивым к термостабильным ингибиторам нормальной сыворотки крови (*ir*), если обратная величина титра в РТГА не превышала 40 ГАЕ. При титре >40 ГАЕ вирус считался ингибиторочувствительным (*is*).

³Вакцинный реассортант на основе эпидемического штамма А/Гонконг/2652/06 качестве вакцины не использовался, антигенно близкородственный эталонному А/Соломоновы острова/03/06.

Таблица 7.3. - Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2), донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе

Вирусы	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t(°C)				RCT ₄₀ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	RCT ₂₅	Фенотип при t(°C)			Чувствительность к термостабильным ингибиторам	
	33°	39°	40°	25°			39°	40°	25°		
<i>Эпидемические вирусы А (H3N2)</i>											
А/Иоганнесбург/33/94	7,7	≤1,2	≤1,2	2,2	>6,5	5,5	ts	ts	non-ca	ir	<10
А/Нанчанг/933/95	7,7	н.и. ¹	≤1,2	≤1,2 ²	>6,5	>6,5	non-ts	ts	non-ca	is	320 ³
А/Вайоминг/3/03	8,5	н.и.	≤1,2	3,2	>7,3	5,3	н.и.	ts	non-ca	ir	20
А/Брисбен/10/07	7,2	н.и.	≤1,2	≤1,2	>6,0	>6,0	н.и.	ts	non-ca	is	320
А/Виктория/361/11	8,2	9,1	6,2	2,0	2,0	6,2	non-ts	non-ts	non-ca	ir	<10
А/Индиана/10/11 (H3N2)v	9,2	9,2	9,2	3,5	0,0	5,5	non-ts	non-ts	non-ca	is	2560
А/Техас/50/12	8,2	7,2	2,2	2,2	6,0	6,0	non-ts	ts	non-ca	ir	40
<i>Реассортантные вакцинные штаммы (H3N2)</i>											
А/17/Иоганнесбург/94/1	8,7	1,7	1,7	5,7	7,0	3,0	ts	ts	ca	ir	<10
А/17/Нанчанг/95/4	9,2	н.и.	1,2	6,2	8,0	3,0	ts	ts	ca	is	320
А/47/Нанчанг/95/13 ⁴	9,2	н.и.	1,2	6,2	8,0	3,0	ts	ts	ca	is	320
А/17/Вайоминг/03/8	9,2	н.и.	≤1,2	5,7	>8,0	3,5	н.и.	ts	ca	ir	20
А/17/Брисбен/07/1	9,2	н.и.	1,7	6,2	7,5	3,0	ts	ts	ca	is	320
А/17/Виктория/11/89	9,2	2,2	≤1,2	8,0	>8,0	1,2	ts	ts	ca	ir	<10
А/17/Индиана/11/72 (H3N2)v	9,6	1,7	≤1,2	8,0	>8,4	1,6	ts	ts	ca	is	2560
А/17/Техас/12/30	10,1	1,7	3,2	7,2	6,9	2,9	ts	ts	ca	ir	40
<i>Донор аттенуации (H2N2)</i>											
А/Ленинград/134/17/57	9,2	1,7	1,2	6,7	8,0	2,5	ts	ts	ca	ir	<10

Здесь и далее: ¹н.и. – не исследовали. ²Нижний порог чувствительности использованного метода.

³обратная величина титра ингибирования гемагглютинации вируса нормальной сывороткой крови лошади в РТГА, прогретой 10 мин при 80°С. Вирус считался устойчивым к термостабильным ингибиторам нормальной сыворотки крови, если обратная величина титра в РТГА не превышала 40 ГАЕ. ⁴Штамм получен на доноре аттенуации А/Ленинград/134/47/57 H2N2 для детской ЖГВ.

Таблица 7.4. - Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа В, донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе

Вирусы	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t (°C)				RCT ₃₇	RCT ₃₈	RCT ₂₅	Фенотип при t (°C)			Чувствительность к термостабильным ингибиторам	
	33°	37°	38°	25°				(lg ЭИД ₅₀ /мл)				
<i>Эпидемические вирусы</i>												
В/Петербург/92/95	7,7	2,7	≤1,2	≤1,2 ¹	5,0	>6,5	>6,5	ts	ts	non-ca	is	2560
В/Иоганнесбург/05/99	8,0	н.и.	2,0	2,2	н.и.	6,0	5,0	н.и.	ts	non-ca	is	320
В/Шанхай/361/02 ^{1,2}	7,0	≤1,2	≤1,2	1,7	>5,8	>5,8	5,3	ts	ts	non-ca	is	320
В/Джилин/20/03	8,7	3,2	≤1,2	2,7	5,5	>7,5	6,0	ts	ts	non-ca	is	2560
В/Малайзия /06/04	9,2	7,4	≤1,2	6,5	1,8	>8,0	2,7	non-ts	ts	ca	ir	20
В/Флорида/07/04	10,2	1,7	1,7	5,2	8,5	8,5	5,0	ts	ts	non-ca	is	320
В/Брисбен/60/08	8,7	≤1,2	≤1,2	2,2	>7,5	>7,5	6,5	ts	ts	non-ca	ir	10
В/Висконсин/1/10	6,9	≤1,2	≤1,2	1,7	>5,2	>5,2	5,2	ts	ts	non-ca	is	640
В/Техас/06/11 ¹	7,0	2,0	≤1,2	4,5	5,0	>5,8	2,5	ts	ts	ca	is	2560
В/Массачусеттс/2/12	8,2	7,3	2,2	3,3	0,9	6,0	4,9	non-ts	ts	non-ca	is	320
<i>Реассортантные вакцинные штаммы</i>												
В/60/Петербург/95/20*	9,2	н.и.	2,2	6,2	н.и.	7,0	3,0	н.и.	ts	ca	is	2560
В/60/Иоганнесбург/99/50*	9,2	н.и.	2,2	6,2	н.и.	7,0	3,0	н.и.	ts	ca	is	320
В/60/Шанхай/02/187 ¹	8,2	н.и.	≤1,2	5,7	н.и.	>7,0	2,5	н.и.	ts	ca	is	320
В/60/Джилин/03/1*	8,7	1,7	≤1,2	5,7	7,0	>8,5	3,0	ts	ts	ca	is	2560
В/60/Малайзия/04/898	8,7	6,2	1,7	6,2	2,5	7,0	2,5	non-ts	ts	ca	ir	20
В/60/Флорида/04/181	8,7	6,2	1,7	6,2	2,5	7,0	2,5	non-ts	ts	ca	is	320
В/60/Брисбен/08/83	8,7	7,2	≤1,2	6,2	1,5	>7,5	2,5	non-ts	ts	ca	ir	10
В/60/Висконсин/10/125	8,7	6,8	≤1,2	6,2	1,9	>7,5	2,5	non-ts	ts	ca	is	640
В/60/Массачусеттс/12/10	10,2	7,7	3,2	7,3	2,5	7,0	2,9	non-ts	ts	ca	is	320
<i>Донор аттенуации</i>												
В/СССР/60/69/525	9,7	8,2	1,7	7,7	1,5	8,0	2,0	non-ts	ts	ca	ir	<10

*эти вакцинные реассортанты подготовлены на неклонированном доноре аттенуации В/СССР/60/69. ¹Резервный штамм. ²В качестве ЖГВ использовался В/60/Джилин/03/1 антигенно близкородственный эталонному вирусу В/Шанхай/361/02.

7.1.1.3 Активность репродукции вакцинных реассортантов в РКЭ. Высокая репродуктивность – важная биологическая характеристика реассортантов для ЖГВ, обеспечивающая эффективную наработку вакцин при промышленном производстве

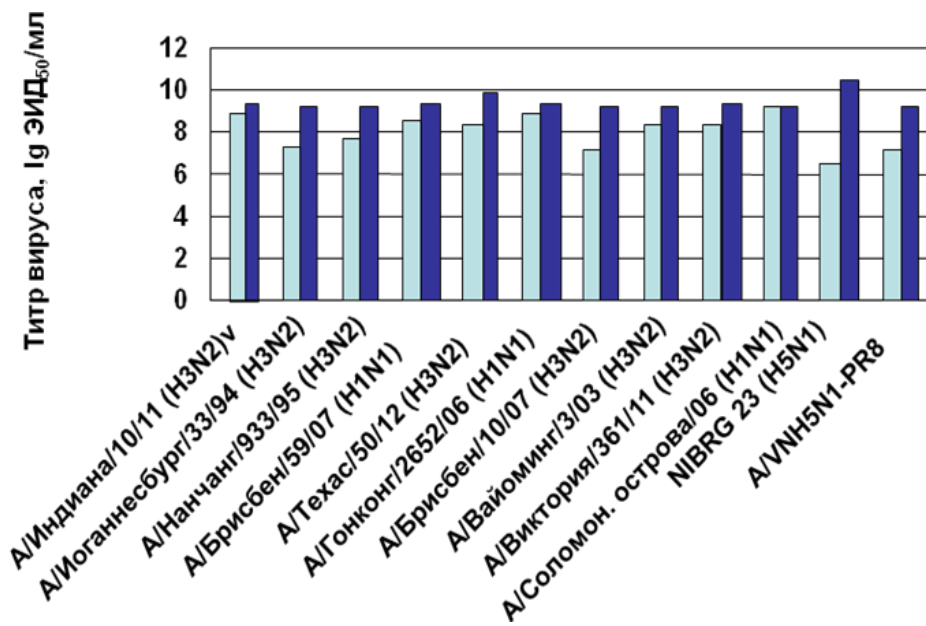
Сравнение ростовых характеристик реассортантов и родительских вирусов в куриных эмбрионах при оптимальной температуре 33°C (табл. 7.2 – 7.4) свидетельствует о том, что вакцинные штаммы неизменно обладают высокой репродуктивной активностью (8,2-10,2 lg ЭИД₅₀/мл).

Во всех случаях репродуктивность вакцинных реассортантов А (H3N2) и В превышает репродуктивность «диких» вирусов на 0,5-2,0 lg ЭИД₅₀/мл (рис. 7.1) и соответствует высокой репродуктивности донора аттенуации (табл. 7.3, 7.4). Эпидемические вирусы сероподтипа А (H1N1), которые были рекомендованы для разработки вакцинных штаммов, хорошо репродуцировались в РКЭ. Их ростовые характеристики сравнимы с показателями репродукции донора аттенуации А17 и вакцинных штаммов, полученных на их основе.

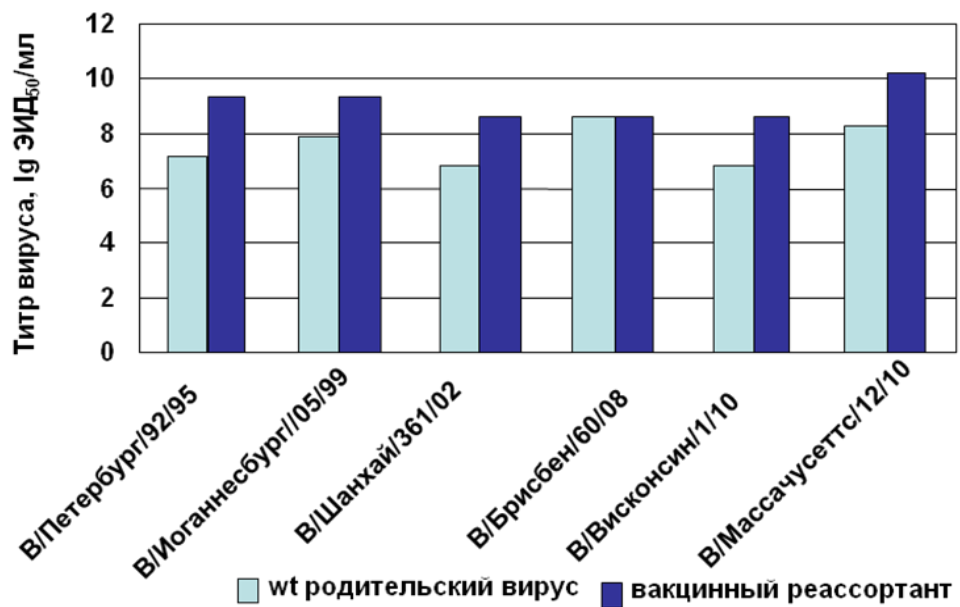
7.1.1.4 Оптимальная множественность инфекции вакцинных реассортантов в РКЭ. Поскольку наработка высокотитражных штаммов является залогом качества и низкой стоимости ЖГВ, то для максимальной репродукции вакцинных реассортантов следует правильно подбирать вводимую в РКЭ дозу. Для выявления такой дозы вирусы накапливали заражением РКЭ серией 10-кратных разведений исходного вирусного пула. Затем определяли инфекционный титр вируса в каждом накопленном разведении. Результаты представлены на рисунке 7.2 (а, б). Титрование вирусов подтвердило, что оптимальной для накопления вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В, также как и для эпидемических вирусов, в частности вируса В/Lee/40, является доза, соответствующая 3 lg ЭИД₅₀ (1000 ЭИД₅₀) во вводимом объеме.

7.1.1.5 Чувствительность реассортантных вакцинных штаммов к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови. В настоящем разделе работы признак ингибиторочувствительности/-устойчивости эпидемических вирусов гриппа исследовали как лабораторный маркер, имеющий значение при подборе оптимальных условий селекции вакцинных реассортантов.

При получении штаммов реассортантной ЖГВ, в качестве селекционирующего фактора, способствующего отбору клонов с HA и NA актуального эпидемического вируса, используется гипериммунная сыворотка против донора аттенуации. В случае получения вакцинного реассортанта на основе ингибиторочувствительного вируса, сывороточные ингибиторы могут неспецифически блокировать его HA и таким образом препятствовать образованию реассортантов с вакцинной формулой генома. Для устранения неспецифических ингибиторов



(a)



(б)

Рис. 7.1 - Репродуктивная способность эпидемических вирусов гриппа А (а) и В (б) и реассортантных штаммов ЖГВ на их основе в развивающихся куриных эмбрионах

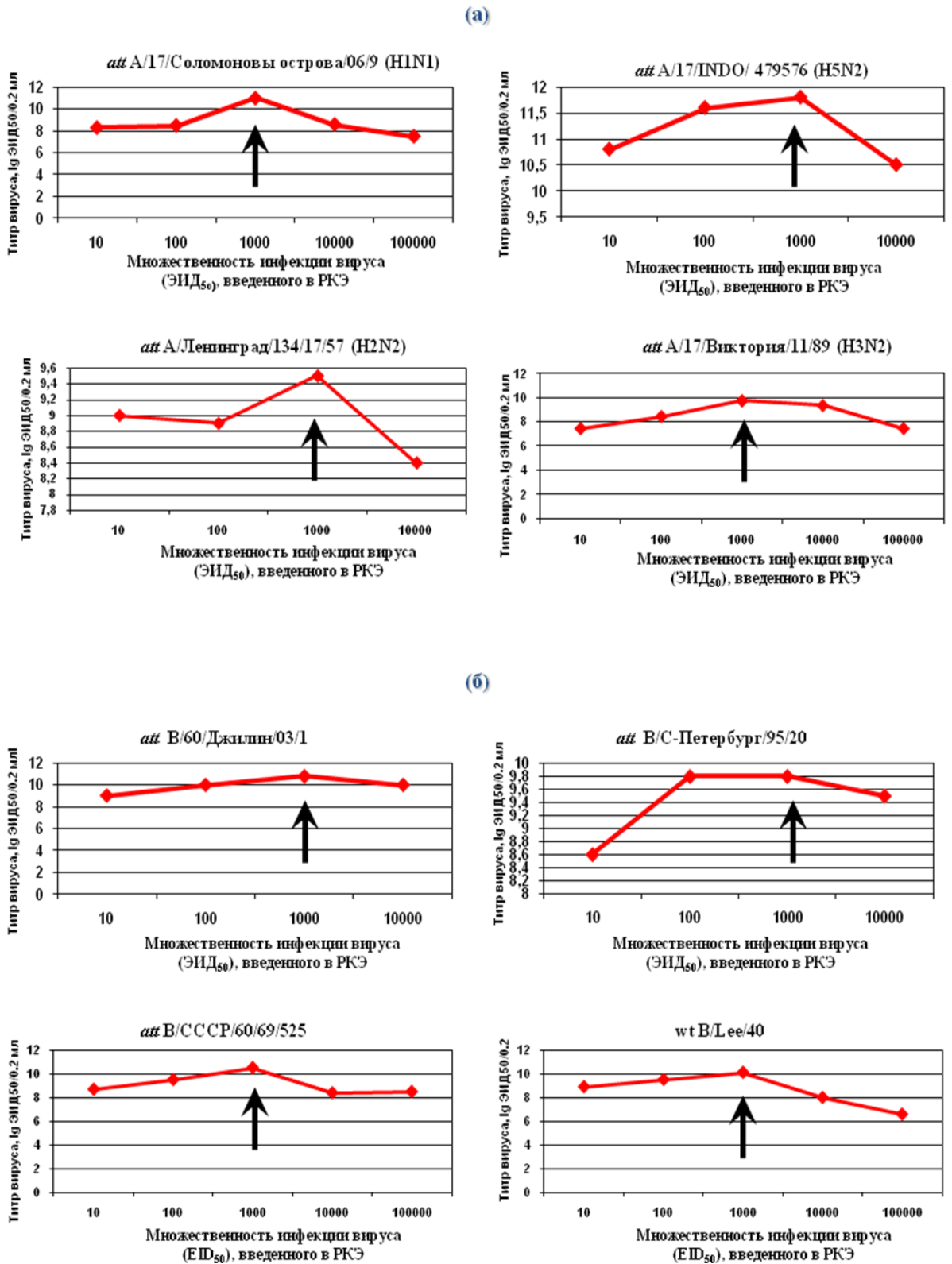


Рис. 7.2 - Репродукция вакцинных реассортантов вирусов гриппа А (а) и В (б) и доноров аттенуации в развивающихся куриных эмбрионах при различной множественности инфекции

сыворотка предварительно прогревается и обрабатывается ферментом RDE (receptor destroying enzyme). Однако полностью инактивировать термостабильные ингибиторы не всегда удается.

Признак чувствительности вируса к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади характеризует рецепторную специфичность его гемагглютинина, и, соответственно, передается реассортантным штаммам с геном НА от эпидемического родителя. Этот известный факт подтверждается анализом ингибиторочувствительности вакцинных реассортантов с формулой генома 6:2, *is* или *ir* фенотип которых всегда соответствовал фенотипу эпидемического родителя (табл. 7.2 – 7.4).

В соответствии с выше сказанным, все вакцинные штаммы на основе ингибитороустойчивых эпидемических вирусов гриппа А (H1N1) характеризовались *ir* фенотипом.

Ингибиторочувствительность вакцинных штаммов на основе вирусов сероподтипа А (H3N2) соответствовала этому признаку у эпидемического родителя.

Все реассортанты на основе вирусов гриппа В линии «Ямагата» были высоко ингибиторочувствительными, а на основе вирусов линии «Виктория» – ингибитороустойчивыми.

7.1.2 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К СЕЗОННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА

7.1.2.1 Однородность популяции холодоадаптированных вакцинных штаммов вирусов гриппа. Популяция вакцинных штаммов всегда генетически однородна, так как в соответствии с протоколом подготовки штаммов конечный продукт клонируется как минимум дважды методом предельных разведений в РКЭ и является потомком одной вирусной частицы, что подтверждается данными генетической стабильности вакцинных штаммов до и после их пятикратного пассирования.

7.1.2.2 Характеристика состава генома. В связи с высокой степенью антигенной изменчивости циркулирующих штаммов вируса гриппа состав гриппозных вакцин обновляется ежегодно. Поскольку время, отводимое на получение и характеристику вакцинных штаммов на новый эпидемический сезон, ограничено, эффективность подготовки реассортантов во многом определяется наличием четко работающего экспресс-метода оценки состава их генома. Конечным этапом отбора вакцинного штамма современной ЖГВ является полное секвенирование генома, но на предварительных этапах, когда нужно быстро проанализировать значительное число реассортантов, необходимы четко работающие методы первичного скрининга.

Характеристика состава генома с помощью RFLP анализа. Для анализа формулы генома современных вирусов гриппа А и В нами была разработана модификация метода RFLP (Restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длин фрагментов рестрикции) с подобранными новыми специфическими праймерами и эндонуклеазами рестрикции, соответствующими нуклеотидным последовательностям современных вирусов гриппа. Пересмотр метода связан с тем, что многие появившиеся в циркуляции в 21-м веке вирусы гриппа А утратили сайты рестрикции, используемые в известном методе RFLP [38, 320]. В частности, это не позволяет оценить принадлежность таких генов реассортантных штаммов, как PB1 и NS (табл. 7.5). Для вирусов гриппа В вообще не существовало универсального варианта RFLP-анализа состава генома. Способ рестриктазного анализа реассортантов вируса гриппа В на основе донора аттенуации В60, описанный в работе [26], был разработан для конкретного вируса гриппа В ветви «Ямагата» и оказался не универсальным.

На основе сравнения нуклеотидных последовательностей современных штаммов вируса гриппа А (H1N1) и А (H3N2) и донора аттенуации А17, представленных в Базе данных [8], были сконструированы две новые пары праймеров для RFLP-анализа генов PB1 и NS (таблица В.1 приложения). В амплифицированных с помощью этих праймеров фрагментах ДНК «диких» вирусов имеются сайты рестрикции для ферментов *Hind* III (PB1 ген) и *Cac* 8I (NS ген). В соответствующих участках генов донора аттенуации эти сайты рестрикции отсутствуют. Время расщепления амплификата ферментом, температура реакционной смеси и условия инкубации были подобраны в соответствии с протоколом фирмы-производителя ферментов.

Были сконструированы также праймеры для RFLP анализа, который может быть использован для самого широкого круга циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа В, принадлежащих как ветви «Виктория», так и «Ямагата».

На основе сравнения нуклеотидных последовательностей современных штаммов вируса гриппа В, депонированных в Базах данных [7, 8], с собственными результатами секвенирования донора аттенуации В/СССР/60/69/525 (табл. В.10 приложения), были идентифицированы области, содержащие уникальные сайты рестрикции, присутствующие в генах, кодирующих нейраминидазу и внутренние белки только донора аттенуации В60/526 либо только эпидемических штаммов. Были сконструированы пары ген-специфических праймеров (табл. В.2 приложения), позволяющих использовать для рестрикционного анализа ПЦР-амплифицированных ДНК-копий фрагментов генома вируса гриппа типа В следующие эндонуклеазы рестрикции: *Msc* I и *Hind* III (PB2 ген), *Bsp* HI (PB1 ген), *Bcl* I (PA ген), *Afl* II (NA ген), *Avr* II (NP ген), *Bsa* I и *Bgl* II (M ген) and *Mae* I (NS ген). Использование перечисленных рестриктаз в комплексе с новыми праймерами позволяет оценить геномный состав

Таблица 7.5 - Рестрикционный анализ участков PB1 и NS генов эпидемических вирусов гриппа А разных лет выделения (по данным GeneBank)

Вирус гриппа А	Идентификационный № последовательности в GeneBank ¹	Наличие сайта рестрикции
Фрагмент PB1 гена ²		
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	M81580	Нет
А/Тайвань/1/86 (H1N1)	DQ508871	Да
А/Пекин/262/95 (H1N1)	CY033620	Да
А/Гонконг/497/97 (H3N2)	AF258822	Да
А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)	EU097791	Да
А/Иллинойс/UR06-0377/2007 (H1N1)	CY025331	Нет
А/Теннесси/UR06-0473/2007 (H1N1)	CY027497	Нет
А/Теннесси/UR06-0078/2007 (H1N1)	CY026897	Нет
А/Теннесси/UR06-0379/2007 (H1N1)	CY037781	Нет
А/Томск/07/2009 (H1N1)	GU367323	Нет
А/Висконсин/629-D00367/2009 (H1N1)	CY050981	Нет
А/Висконсин/629-S0339/2009 (H1N1)	CY051461	Нет
Фрагмент NS гена ³		
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	M81578	Нет
А/Тайвань/1/86 (H1N1)	DQ508877	Да
А/Пекин/262/95 (H1N1)	CY033618	Да
А/Гонконг/497/97 (H3N2)	AF256182	Да
А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)	DQ508861	Да
А/Нью Йорк/933/2006 (H3N2)	CY020105	Нет
А/Техас/08/2009 (H1N1)	GQ168853	Нет
А/Канзас/02/2009 (H1N1)	GQ168856	Нет
А/Техас/22/2009 (H1N1)	GQ160572	Нет
А/Техас/05/2009 (H1N1)	FJ981611	Нет
А/Техас/04/2009 (H1N1)	FJ981620	Нет

¹Нуклеотидная последовательность, депонированная в GeneBank, доступна на вебсайте [8].

²Аmplифицирован фрагмент гена с 5'-конца «+» цепи РНК на участке от 1374 до 1614 нуклеотида; позиция нуклеотида для рестрикции эндонуклеазой *Hind* III – 1459; прямой праймер – GGGAATTGAACATATCGA; обратный праймер – TATTGTCAGTTTCTCTGT [320].

³Аmplифицирован фрагмент гена с 5'-конца «+» цепи РНК на участке от 673 до 890 нуклеотида; позиция нуклеотида для рестрикции эндонуклеазой *Cac* 8I – 798; прямой праймер – CAAAACAGAAACGGAAAA; обратный праймер AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATCATTA [320].

реассортантов, подготовленных на основе донора аттенуации B60/525 и широкого спектра циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа типа В.

В целом, представленная модификация метода RFLP позволяет успешно оценивать состав генома реассортантных вирусов, подготовленных на основе доноров аттенуации A17 и B60/525 и современных штаммов вируса гриппа А и В.

Пример использования метода RFLP-анализа для определения принадлежности полимеразных генов реассортантного вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm отображен на рисунке 7.6.

Характеристика состава генома с помощью мультиплексной («да-нет») ПЦР. Вариант метода мультиплексной ПЦР был разработан для анализа состава генома реассортантов ЖГВ на основе пандемического А (H1N1pdm)2009 и обладающих пандемическим потенциалом А (H5N1) вирусов гриппа. Поскольку пандемические вирусы значительно отличаются от сезонных, для них потребовался подбор индивидуальных праймеров, позволяющих дифференцировать гены этих вирусов от генов донора аттенуации. Наборы разработанных праймеров к генам пандемических вирусов гриппа представлены в (табл. В.7-В.8 приложения).

При мультиплексной ПЦР кДНК синтезируется на основе универсальных олигонуклеотидных праймеров, что позволяет в одной реакции накопить все фрагменты генома вируса гриппа. Далее амплифицированная кДНК используется в качестве матрицы для ПЦР на основе праймеров, специфичных только для донора аттенуации или только для вируса «дикого» типа. Пары праймеров к родительским вирусам подбираются так, что амплифицированные фрагменты отличаются между собой по размеру. Это позволяет использовать метод в варианте, который работает как «да-нет» ПЦР. В этом случае проводятся две ПЦР, в каждой реакции кДНК родительских вирусов и реассортантных клонов амплифицируется с одной парой праймеров – либо к донору, либо к эпидемическому родителю. В итоге, либо наблюдается амплификация фрагмента гена, либо амплификации нет. Электрофорез ПЦР-продуктов, позволяет четко дифференцировать происхождение исследуемого гена и оценить степень чистоты вакцинного препарата. Пример изучения состава генома реассортантного штамма А/17/Калифорния/09/38 (H1N1)pdm представлен на рис. 7.7. Метод, успешно зарекомендовал себя для анализа состава генома также сезонных вирусов гриппа. Праймеры, подобранные для сезонных вирусов гриппа А(H1N1), А(H3N2) и В, представлены в табл. В.4 - В.6 приложения. На рис. 7.3 и 7.4 показаны примеры анализа принадлежности отдельных генов в составе реассортантов на основе вирусов гриппа А и В.

Таким образом, разработанные модификации ПЦР-анализа состава генома различных реассортантных штаммов вируса гриппа типа А и В позволяют быстро и четко установить принадлежность генов одному из родительских вирусов, что регулярно используется в практике подготовки вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины.

Структура генома всех реассортантов, отобранных в качестве кандидатов для ЖГВ, на основе сезонных вирусов гриппа и доноров аттенуации соответствовала формуле 6:2, т.е. шесть внутренних генов (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) реассортанты наследовали от *ts/ca* донора аттенуации, а HA и NA – от соответствующего эпидемического вируса (табл.7.2-7.4).

7.1.2.3 *Оценка генетической стабильности аттенуирующих мутаций.* Стабильность генетических признаков вакцинных штаммов необходимое условие их безвредности. Генетическую стабильность вакцинных штаммов изучали сравнением сохранности кодирующих мутаций во внутренних генах до и после их пятикратного пассирования в куриных эмбрионах при оптимальной температуре.

Методом RFLP рестрикционного анализа ДНК копий генов [38] продемонстрирована идентичность мутаций во всех внутренних генах донора аттенуации А17 и вакцинных штаммов вирусов гриппа А до и после их пятикратного пассирования, в том числе, в генах полимеразного комплекса (PB2, PB1, PA), ответственных за аттенуирующий фенотип (табл. 7.6). Идентичность мутаций в генах, кодирующих внутренние белки донора аттенуации В60/525 и вакцинных штаммов вирусов гриппа В, продемонстрирована по результатам секвенсов фрагментов генома, содержащих специфичные для донора мутации (табл. 7.7). Дополнительно, для подтверждения стабильности свойств, проведена фенотипическая и генетическая характеристика доноров аттенуации А и В и нескольких реассортантных вакцинных штаммов после серии пассажей в РКЭ не только при оптимальных, но и при непермиссивных для репродукции температурах инкубации.

Реассортантные вакцинные штаммы А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) (А/17/НК) [39], А/17/Панама/99/242 (H3N2) (А/17/Пан) [40] и В/60/Джилин/03/1 (В/60/Дж) и доноры аттенуации А17, В60/525 пятикратно пассировали в РКЭ при оптимальной 32°C, допустимой 37°C и неразрешающей 40°C (38°C для вирусов гриппа В) температурах инкубации. Для каждого пассажа заражали по 3-6 эмбрионов вирусом в дозе 6 lg ЭИД₅₀/мл.

Оценку стабильности свойств вакцинных штаммов проводили по сохранности *ts/ca* фенотипических признаков и аттенуирующих мутаций во внутренних генах, унаследованных от доноров аттенуации.

Все изученные вирусы после пятикратного пассирования в РКЭ в интервале температур 32-37°C сохраняли маркеры температурочувствительности и холодоадаптированности, присущие исходным вариантам (табл. 7.8, 7.9).

После серии пассажей в диапазоне температур 32-37°C не наблюдается ни одной утраты или замены присущих *ts/ca* донорам аттенуации кодирующих мутаций, описанных в таблицах 7.6 и 7.7.

Для культивирования аттенуированных вирусов при непермиссивных для них температурах заражали по 10 РКЭ неразведенным вирусосодержащим материалом. Пассирование вирусов гриппа А при 40°C и В при 38°C приводило к abortивной инфекции уже на втором пассаже (табл. 7.10)

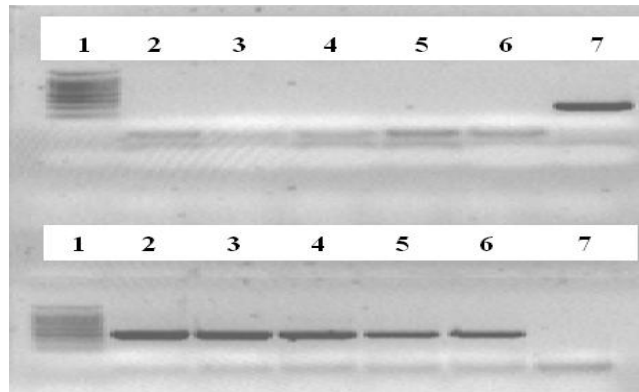


Рис. 7.3 - Пример анализа методом «да-нет»-ПЦР принадлежности гена PA у реассортантов из скрещивания эпидемического вируса А/Виктория/361/2011 (H3N2) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (А17).

Горизонтальный электрофорез в 1,7% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидиума бромиды.

Верхний ряд: амплифицированные фрагменты кДНК гена PA с праймерами к эпидемическому вирусу А (H3N2).

Нижний ряд: амплифицированные фрагменты кДНК гена PA с праймерами к донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

1 - маркер молекулярного веса;

2 - ген PA донора аттенуации А17;

3,4,5,6 - ген PA реассортантных клонов, кандидатов в вакцинные штаммы;

7 - ген PA вируса А/Виктория/361/2011 (H3N2).

Четко продемонстрировано происхождение гена PA исследуемых реассортантных штаммов от донора аттенуации А17.

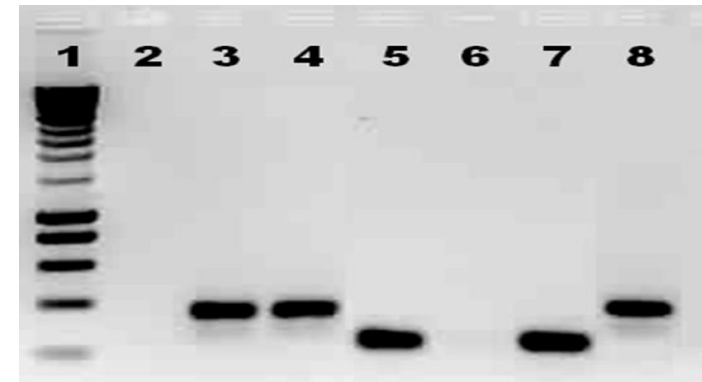


Рис.7.4 - Пример анализа методом «да-нет»-ПЦР принадлежности гена NA у реассортантов из скрещивания эпидемического вируса В/Висконсин/1/2010 с донором аттенуации В/СССР/60/69/525.

Горизонтальный электрофорез в 1,7% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидиума бромиды.

1 - маркер молекулярного веса;

2 - NA эпидемического вируса с праймерами, к донору аттенуации;

6 - NA донора аттенуации с праймерами к эпидемическому вирусу гриппа В;

3- NA эпидемического вируса с праймерами к эпидемическому вирусу;

4 - и 8- NA реассортантов с праймерами к эпидемическому вирусу;

5 - и 7- NA донора аттенуации с праймерами к донору аттенуации.

Четко продемонстрировано происхождение гена NA исследуемых реассортантных штаммов от вируса В/Висконсин/1/2010.

Таблица 7.6 - Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вакцинных штаммов до и после пятикратного пассирования в РКЭ при 32°C (по данным ПЦР–рестрикционного анализа)

Ген	Нуклеотид	Позиция аминокислоты	<i>non-ts/ non-ca</i> вирус Лен/wt ¹	Аминокислотные замены во внутренних генах <i>ts/ca</i> вирусов по сравнению с вирусом «дикого» типа		
				<i>ts/ca</i> A17	№ пассажа вакцинного реассортанта при 32°C	
					0	5
PB2	1459	478	Val	Leu	Leu	Leu
PB1	819	265	Lys	Asn	Asn	Asn
	1795	591	Val	Ile	Ile	Ile
PA	107	28	Leu	Pro	Pro	Pro
	1045	341	Val	Leu	Leu	Leu
NP	ген NP донора аттенуации A17 не содержит кодирующих мутаций					
M1	68	15	Ile	Val	Val	Val
M2	969	86 ²	Ala	Thr	Thr	Thr
NS2	798	100	Met	Ile	Ile	Ile

¹Эпидемический вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) является «диким» предшественником донора аттенуации A17. ²Популяция донора аттенуации A17 гетерогенна по этой позиции, часть ее не содержит мутацию Ala-86-Thr [321, 323].

Генетическая стабильность аттенуированных холодоадаптированных вирусов гриппа А и В при пассировании в куриных эмбрионах не только при оптимальных, но и при повышенных температурах инкубации и невозможность обратной переадаптации *ts/ca* вирусов к репродукции при повышенной температуре свидетельствует о высокой генетической стабильности аттенуирующих мутаций в их геноме.

з) Секвенирование генома штаммов ЖГВ. Прямым нуклеотидным секвенированием генов вакцинных штаммов подтверждено, что все кодирующие замены, охарактеризованные для доноров аттенуации, присутствовали в генах реассортантных штаммов (табл. 7.6 и 7.7).

Секвенирование генома исходного и пассированного вакцинного реассортанта свидетельствует о том, что после 5 серийных пассажей нуклеотидная последовательность вирусов сохраняется неизменной.

Таблица 7.7 - Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации В/СССР/60/69/525 и вакцинных штаммов до и после пятикратного пассирования в РКЭ при 32°C (по данным частичного секвенирования фрагментов генома)

Ген	Нуклеотид	Позиция аминокислоты	<i>non-ts/ non-ca</i> wt вирус ¹	Аминокислотные замены во внутренних генах <i>ts/ca</i> вирусов по сравнению с вирусом «дикого» типа		
				<i>ts/ca</i> B60/525	№ пассажа вакцинного реассортанта при 32°C	
					0	5
PB2	979	319	Leu	Gln	Gln	Gln
	1423	467	Glu	Gly	Gly	Gly
	1939	639	Arg	Lys	Lys	Lys
PB1		–	–	–	–	–
PA	475	149	Ser	Asn	Asn	Asn
	1600	524	Thr	Lys	Lys	Lys
NP	ген NP донора аттенуации B60/525 не содержит кодирующих мутаций					
M1	524	167	Arg	Lys	Lys	Lys
BM2	1029	87	Ile	Val	Val	Val
NS1	345	104	Cys	Ser	Ser	Ser
NS2	–	–	–	–	–	–

¹Поскольку «дикий» предшественник донора аттенуации В/СССР/60/69/525 (B60/525) неизвестен, нуклеотидные (аминокислотные) последовательности донора B60/525 сравнивали с последовательностями «диких» вирусов гриппа В, полученных из баз данных, как описано в главе 5.1.

Таблица 7.8 - Температурочувствительность и холодадаптированность вакцинных штаммов вируса гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) до и после их пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при разрешающих температурах

Вирус	№ пассажа	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при			RCT ₂₆	RCT ₄₀
		26°C	32°C	40°C		
A17 (H2N2)	До пассирования	7.2	9.3	1.9	2.1	7.4
	5 пассаж при 32°C	6.9	9.0	2.0	2.1	7.0
	5 пассаж при 37°C	7.2	9.2	2.2	2.0	7.0
НК/145 ¹ (H1N1)	До пассирования	8.2	10.2	3.2	2.0	7.0
	5 пассаж при 32°C	7.6	10.0	2.8	2.4	7.2
	5 пассаж при 37°C	6.4	10.2	3.0	3.8	7.2
Пан/242 ² (H3N2)	До пассирования	5.8	9.0	2.4	3.2	6.6
	5 пассаж при 32°C	6.7	9.5	3.0	2.8	6.5
	5 пассаж при 37°C	7.0	9.7	3.4	2.7	6.3

¹A/17/Новая Каледония/99/145(H1N1); ²A/17/Панама/99/242 (H3N2).

Таблица 7.9 - Температурочувствительность и холодоадаптированность вакцинного штамма вируса гриппа В и донора аттенуации В/СССР/60/69 до и после их пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при разрешающих температурах

Вирус	№ пассажа	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t			RCT ₂₅	RCT ₃₇
		25°C	32°C	37°C		
В/СССР/60/69	До пассирования	7.2	9.2	6.7	2.0	2.5
	5 пассаж при 32°C	7.2	9.2	6.7	2.0	2.5
	5 пассаж при 37°C	6.7	9.7	7.2	3.0	2.5
В/60/Джилин/03/1	До пассирования	4.2	7.7	7.2	3.5	0.5
	5 пассаж при 32°C	4.2	7.7	7.7	3.5	0
	5 пассаж при 37°C	2.7	7.7	7.7	5.0	0

Таблица 7.10 - Характеристика репродукции доноров аттенуации А и В и реассортантных штаммов ЖГВ на их основе в процессе пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при непермиссивных температурах

№ пассажа вирусом	Титр вируса гриппа А (lg ЭИД ₅₀ /мл) при 40°C			Титр вируса гриппа В (lg ЭИД ₅₀ /мл) при 38°C	
	А17	НК/145 ¹	Пан/242 ²	В60/525	В60/Дж ³
1	1.9	3.2	2.4	0	1.2
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0

¹А/17/Новая Каледония/99/145(Н1N1); ²А/17/Панама/99/242 (Н3N2); ³В/60/Джилин/03/1.

7.1.3 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К СЕЗОННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

7.1.3.1 Тест на острую токсичность. Заключение об отсутствии патогенности сезонных вакцинных штаммов для лабораторных животных делали на основании теста на острую токсичность при однократном внутрибрюшинном введении препарата беспородным мышам и подкожном введении препарата морским свинкам.

В таблице 7.11 приведены результаты оценки безвредности сезонных вакцинных штаммов вируса гриппа А и В по описанной в главе 4 методике. Как видно из таблицы, реассортантные вакцинные штаммы апатогенны для лабораторных животных при внутрибрюшинном и подкожном введении. Однократное введение вакцинных штаммов в максимально возможном объеме для животных данного вида не вызывало гибели, изменения внешнего вида,

подвижности, поведенческих реакций, потребления пищи и воды экспериментальными животными.

7.1.3.2 *Тест на подострую токсичность.* Двукратное интраназальное введение вакцинного штамма морским свинкам не вызывало гибели экспериментальных животных (табл. 7.11) и не приводило к изменению их внешнего вида, поведения, не отражалось на потреблении ими пищи и воды. Результаты исследования свидетельствуют, что кандидаты в вакцинные штаммы, также как и доноры аттенуации А17 и В60/525, полностью нетоксичны для мышей и морских свинок при интраназальном двукратном введении массивных доз вирусов.

Таблица 7.11 - Изучение патогенности вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В после внутрибрюшинного (в/бр), подкожного (п/к) и интраназального (и/н) введения мышам и морским свинкам

Вакцинный штамм	мыши		морские свинки			клиниче- ские симптомы
	всего	погибло при введении в/бр	всего	погибло при введении		
				п/к	и/н	
А/17/Иоганнесбург/94/1(Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/17/Нанчанг/95/4 (Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/47/Нанчанг/95/13 (Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/17/Вайоминг/03/8(Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/17/Гонконг/06/5977(Н1N1)	10	0	20	0	0	0
А/17/Соломон.о-ва/06/9 (Н1N1)	10	0	20	0	0	0
А/17/Брисбен/07/28 (Н1N1)	10	0	20	0	0	0
А/17/Брисбен/07/1 (Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/17/Виктория/11/89(Н3N2)	10	0	20	0	0	0
А/17/Техас/12/30 (Н3N2)	10	0	20	0	0	0
В/60/Петербург/95/20	10	0	20	0	0	0
В/60/Джилин/03/1	10	0	20	0	0	0
В/60/Малайзия/04/898	10	0	20	0	0	0
В/Флорида/07/04	10	0	20	0	0	0
В/60/Брисбен/08/83	10	0	20	0	0	0
В/60/Висконсин/10/125	10	0	20	0	0	0
донор att А17	10	0	20	0	0	0
донор att В60/525	10	0	20	0	0	0

7.1.4 РЕПРОДУКТИВНОСТЬ СЕЗОННОЙ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ В НАБЛЮДЕНИЯХ НА ДЕТЯХ 3–6 ЛЕТ

Репродуктивность вакцинных штаммов в клетках носоглотки является показателем эффективности ЖГВ, обеспечивающим иммунный ответ у вакцинированных лиц.

Важной характеристикой вакцинных штаммов вируса гриппа является также отсутствие трансмиссивности аттенуированного вируса от вакцинированных контактным лицам.

Вероятность трансмиссивности вакцинных вирусов гриппа, обладающих высокой способностью к реассортации, вызывает настороженность теоретической возможностью появления нового эпидемического реассортанта в результате скрещивания с дикими циркулирующими вирусами. Хорошая репродуктивность вакцинных вирусов в носоглотке не свидетельствует о возможности его высокой трансмиссивности.

Несмотря на то, что реассортантные вакцинные штаммы успешно получают в РКЭ, некоторые современные вирусы гриппа удается выделять исключительно из клеток млекопитающих, и они сложно поддаются адаптации к РКЭ [33, 363], поэтому в настоящем исследовании для накопления из мазков вакцинных вирусов, прошедших циклы репродукции в клетках респираторного тракта человека, использовались две системы: РКЭ и культура клеток MDCK.

Сравнительное изучение репродуктивности в клетках носоглотки, возможности трансмиссивности и иммуногенности штаммов ЖГВ исследовали на детях 3–6 лет, посещающих детские дошкольные учреждения, в эпидемический сезон 2004–2005 гг.

В состав коммерческой трехвалентной ЖГВ входили компоненты А/17/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2) и В/60/Джилин/03/1, подготовленные на основе штаммов, рекомендованных ВОЗ на эпидемический сезон 2004–2005 гг. (А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Вайоминг/3/03 (H3N2) и В/Джилин/20/03 – В/Пекин/184/93-like), и доноров аттенуации А17 и В60.

24 ребенка были привиты однократно ЖГВ, еще 28 детей, находящихся в тесном контакте с привитыми, получили препарат «плацебо». Выделение вирусов из носовых ходов детей проводили через 2, 3 и 4 дня после введения препарата параллельно в РКЭ и MDCK. Забор крови для РТГА проводился до вакцинации и через 21 день после вакцинации.

Иммуногенность вакцинных штаммов определяли по количеству приростов титров антител в сыворотках привитых, обработанных препаратом RDE, в РТГА с 1% взвесью эритроцитов человека группы 0(I), Rh⁺. В качестве антигенов использовали вирусы гриппа, гомологичные вакцинным штаммам.

Выделение вирусов гриппа из мазков в РКЭ и культуре клеток MDCK составило соответственно 87,5% и 98,5%, причем у 21 ребенка вирус выделился одновременно и в РКЭ и в культуре MDCK, а у двоих – только в культуре. У одного ребенка из 24 вирус не выделился ни в РКЭ, ни в культуре. В целом, в одной или в другой системе культивирования, в 96% случаев был выделен хотя бы один из компонентов вакцины (табл. 7.12).

Таблица 7.12 - Выделение штаммов живой гриппозной вакцины из носовых мазков в РКЭ и культуре клеток MDCK на 2–4 дни после вакцинации детей 3–6 лет

Группа (количество детей в группе)	Число детей, от которых был выделен вакцинный вирус	Выделение изолятов в:	
		РКЭ	MDCK
Вакцина (24)	21 из 24	+	+
	2 из 24	–*	+
	1 из 24	–	–
Плацебо (28)	28 из 28	–	–

*Здесь и в таблице 7.13 – вирус не выделен после трех пассажей в РКЭ или культуре клеток MDCK

Выделенные вирусы гриппа типировались в РТГА с гипериммунными крысиными сыворотками к вирусам А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Вайоминг/3/03 (H3N2) и В/Джилин/20/03. Результаты типирования выделенных вакцинных вирусов приведены в таблице 7.13. В двух изолятах, которые удалось накопить только в культуре MDCK, типировался либо А(H1N1) либо А(H3N2) компонент вакцины. В 29% (7 из 24) исследованных образцов из РКЭ и культуральных изолятов типировались одинаковые вакцинные компоненты. Так, от трех привитых лиц в РКЭ и в MDCK выделился только вирус А(H1N1), а от четырех – только вакцинный вирус гриппа В.

Интересно, что в пяти образцах (21%), положительных как в РКЭ, так и в культуре MDCK, в разных системах выделались разные вакцинные составляющие. В четырех из них компонент А(H1N1) был чувствителен только к РКЭ, тогда как компонент В – только к культуре клеток. В одном образце с помощью РКЭ выделился вирус А(H3N2), а с помощью культуры – А(H1N1).

Очевидное преимущество культуры для выделения вакцинных вирусов демонстрирует группа из 6 образцов (25%), в которых с помощью этой системы удалось выделить большее количество компонентов ЖГВ, причем все выделенные в РКЭ составляющие также выделялись и в культуре. Только у одного ребенка (4%) наблюдалась обратная картина – в MDCK выделился всего один вакцинный вирус (В), а в РКЭ – два: А(H1N1) и В. По два вакцинных компонента типировались в двух культуральных и «эмбриональных» изолятах, при этом в сумме из данных образцов выделались все три составляющие ЖГВ.

Таким образом, репродуктивность штаммов трехвалентной ЖГВ у вакцинированных детей, выявленная с помощью обеих систем культивирования изолятов (РКЭ и MDCK), составила 66,7% (16 из 24) для компонентов А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) и В/60/Джилин/03/1 и 29,2% (7 из 24) для компонента А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2).

Таблица 7.13 - Результаты типирования штаммов выделенных от привитых живой гриппозной вакциной детей 3–6 лет, на 2–4 дни после вакцинации в РКЭ и культуре клеток MDCK

Число детей, от которых был выделен вакцинный вирус	Выделены в РКЭ			Выделены в MDCK			ВСЕГО		
	H1	H3	В	H1	H3	В	H1	H3	В
<i>Выделены только в культуре клеток:</i>									
1 из 24	–	–	–	H1	–	–	H1	–	–
1 из 24	–	–	–	–	H3	–	–	H3	–
<i>Выделены и в РКЭ и в культуре клеток. В «эмбриональном» изоляте и в культуральном изоляте типированы те же вакцинные компоненты:</i>									
3 из 24	H1	–	–	H1	–	–	H1	–	–
4 из 24	–	–	В	–	–	В	–	–	В
<i>Выделены и в РКЭ и в культуре клеток. В «эмбриональном» изоляте типированы вакцинные компоненты, отличные от типированных в культуральном изоляте:</i>									
3 из 24	H1	–	–	–	–	В	H1	–	В
1 из 24	–	H3	–	H1	–	–	H1	H3	–
<i>Выделены и в РКЭ и в культуре клеток, при этом в «эмбриональном» изоляте типировано больше вакцинных компонентов, чем в культуральном изоляте:</i>									
1 из 24	H1	–	В	–	–	В	H1	–	В
<i>Выделены и в РКЭ и в культуре клеток, при этом в культуральном изоляте типировано больше вакцинных компонентов, чем в «эмбриональном» изоляте:</i>									
3 из 24	H1	–	–	H1	–	В	H1	–	В
1 из 24	–	H3	–	–	H3	В	–	H3	В
1 из 24	H1	–	–	H1	H3	–	H1	H3	–
1 из 24	–	–	В	–	H3	В	–	H3	В
<i>Выделены и в РКЭ и в культуре клеток, при этом в культуральном и «эмбриональном» изолятах типированы и одинаковые, и разные вакцинные компоненты:</i>									
1 из 24	H1	H3	–	–	H3	В	H1	H3	В
1 из 24	–	H3	В	H1	–	В	H1	H3	В
ВСЕГО ИЗ 24:	13	4	7	10	5	16	16	7	16

Исследование трансмиссивности ЖГВ. Параллельно с группой детей, привитых трехвалентной ЖГВ, анализировалась группа детей, получивших препарат «плацебо» (аллантоисная жидкость куриного эмбриона). Отбор детей в обе группы проводили так, чтобы в отдельных коллективах находилось примерно равное число представителей каждой группы. Ни у кого из 28 лиц группы плацебо после трех пассажей вирусы не выделились ни в РКЭ, ни в культуре MDCK (табл.7.12). Эти результаты свидетельствуют о том, что живая гриппозная вакцина была нетрансмиссивна.

Иммуногенность ЖГВ. Парные сыворотки крови, взятые до вакцинации и через 21 день после вакцинации, изучались для оценки иммуногенности ЖГВ у детей. Достоверным приростом титров сывороточных антител считали их 4–х кратное и более увеличение во второй

сыворотке по сравнению с первой. Процент сероконверсий рассчитывался как отношение количества лиц с 4–х кратным и более приростом титра антител к общему числу привитых.

На рис.7.5 представлены результаты изучения иммуногенности и репродуктивности в носоглотке штаммов, входящих в состав трехвалентной ЖГВ. Приживляемость вакцинного вируса хорошо коррелировала с его иммуногенностью.

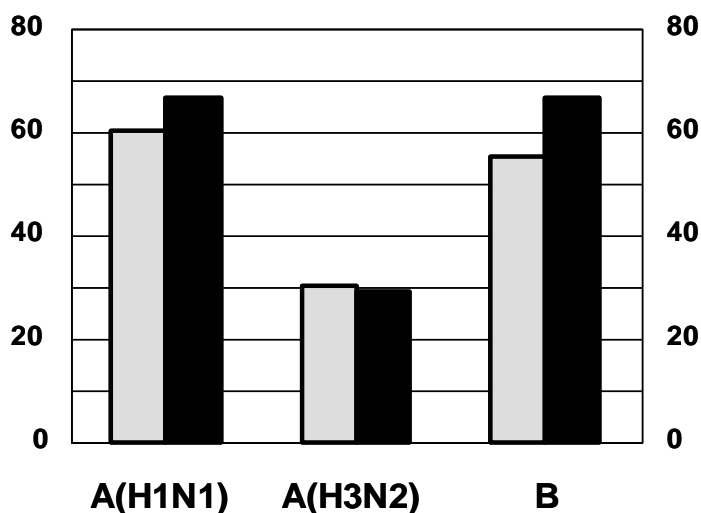


Рис. 7.5 - Репродуктивность и иммуногенность вакцинных штаммов, входящих в состав трехвалентной живой гриппозной реассортантной вакцины, в наблюдениях на детях 3-6 лет

По оси абсцисс – вакцинный вирус, по оси ординат – репродуктивность вакцинного вируса в % (темные столбики) и сероконверсии в % (светлые столбики).

Таким образом, результаты выделения и типирования вакцинных штаммов от привитых лиц позволяют сделать вывод о том, что оптимальный эффект выделения вакцинных вирусов дает использование комбинации двух систем – РКЭ и культуры клеток MDCK. В данном случае удается получить наиболее полный набор изолятов и адекватно оценить репродуктивность вакцинных штаммов ЖГВ у привитых лиц. Репродуктивность вакцинного вируса хорошо коррелировала с его иммуногенностью для детей. Не наблюдалась трансмиссивность ЖГВ от привитых контактными детям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Для регулярного обновления состава коммерческой ХА реассортантной ЖГВ подготовлено, запатентовано и внедрено в практику здравоохранения девятнадцать холодоадаптированных реассортантных вакцинных штаммов, на основе которых с 1995 года по настоящее время осуществлялся промышленный выпуск ЖГВ для взрослых и для детей.

Все вакцинные штаммы стабильно характеризовались следующими показателями:

- обладали признаком высокой репродуктивности в РКЭ;

- обладали признаком холодоустойчивости в опытах на РКЭ (*sa* маркер);
- обладали признаком температурочувствительности в опытах на РКЭ (*ts* маркер);
- характеризовались стабильностью фенотипических свойств и генетического состава после серии пассажей в РКЭ при перmissive и повышенных температурах инкубации;
- были полностью нетоксичными для экспериментальных животных при введении массивных доз вируса в тестах на острую и подострую токсичность.

Таким образом, штаммы ЖГВ, подготовленные на основе сезонных вирусов гриппа, стабильно характеризуются сочетанием полезных признаков необходимых вакцинным штаммам: антигенной специфичностью эпидемических вирусов, структурой генома 6:2, оптимальной для реассортантных вакцинных штаммов, характерной для доноров аттенуации температурочувствительностью, холодоадаптированностью и безвредностью для лабораторных животных, что коррелирует с аттенуацией для человека. По биологическим свойствам вакцинные реассортанты соответствуют требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам на живую гриппозную вакцину для интраназального применения для взрослых и для детей [127].

7.2 РАЗРАБОТКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ПАНДЕМИЧЕСКОМУ ВИРУСУ ГРИППА А(Н1N1)_{pdm2009} И ЕГО ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

. В соответствии с глобальным планом ВОЗ по подготовке к пандемии гриппа и в рамках утвержденного Правительством Российской Федерации плана мероприятий на 2009 год по предупреждению распространения заболеваний, вызванных высокопатогенным вирусом гриппа [103], был подготовлен вакцинный штамм живой гриппозной аттенуированной вакцины на основе возбудителя пандемии 2009 года вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1)_{pdm} [580] и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Для вакцинных штаммов на основе пандемических и потенциально пандемических вирусов гриппа разработаны требования к проведению доклинических и клинических исследований, отличающиеся от таковых для сезонных вакцин [564]. В частности, обязательно исследование безвредности и иммуногенности кандидатов в вакцину на лабораторных животных. Наиболее пригодной моделью животных для изучения гриппозных вакцин являются хорьки (*Mustela putoris furo*) [405].

7.2.1 ПОДГОТОВКА РЕАССОРТАНТНОГО ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ПАНДЕМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ РЕАССОРТАЦИИ

В результате скрещивания родительских вирусов, серии селективных пассажей и трех клонирований методом предельных разведений согласно методу классической реассортации в РКЭ, описанном в главе 4 и представленном на схеме 4.1, был получен реассортантный вакцинный штамм А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1). Формула генома 6:2 вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) соответствует требованиям, предъявляемым к штаммам живой гриппозной вакцины: гены, кодирующие поверхностные негликозилированные белки НА и NA принадлежат пандемическому вирусу А/Калифорния/07/2009 (H1N1), гены, кодирующие внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), принадлежат донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

7.2.2 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАССОРТАНТНОГО ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ПАНДЕМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

7.2.2.1 Чувствительность к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови. Чувствительность вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) и его «дикого» родителя А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови оценивали в стандартной реакции РТГА с неиммунными сыворотками крови лошади, морской свинки и кролика. В качестве ингибиторочувствительного контрольного вируса был использован штамм вируса гриппа А/Малайзия/01/04 (H3N2), в качестве ингибиторостойчивого контроля – вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2). Как показано в таблице 7.14, вакцинный штамм А/17/Калифорния/09/38 (H1N1), как и родительский вирус А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm, высокоустойчивы к термостабильным ингибиторам сыворотки крови морской свинки, кролика, лошади.

7.2.2.2 Фенотипические свойства вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) и стабильность его фенотипических признаков изучали сравнением его способности к репродукции при оптимальной температуре (32–33°C) и при температурах за пределами температурного оптимума (26°C и 40°C) до и после его пятикратного пассирования в куриных эмбрионах.

Отличительной особенностью вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) является свойство замедленной репродукции в РКЭ в сравнении с другими вирусами гриппа А. Так, для достижения максимальных инфекционных титров требуется его инкубация при 32–

33°C в течение 72 часов. В этом случае достигается увеличение титра в среднем на $2,8 \pm 0,6 \lg$ ЭИД₅₀/мл по сравнению с титрами, которых вирус достигает при инкубации в течение 48 часов (таблица 7.15).

Таблица 7.14 - Чувствительность вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови

Вирус	Титр сыворотки в РТГА			Чувствительность к ингибиторам
	Морская свинка	Лошадь	Кролик	
А/Ленинград/134/57 (H2N2)	< 10	< 10	<10	Устойчив
А/Малайзия/01/04 (H3N2)	1280	2560	640	Чувствителен
А/Калифорния/07/2009 (H1N1) pdm	< 10	< 10	< 10	Устойчив
А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)	< 10	< 10	< 10	Устойчив

Таблица 7.15 - Прирост инфекционного титра вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) при накоплении в развивающихся куриных эмбрионах в течение 48 и 72 часов при 32°C

Титр вируса в зависимости от времени инкубации, \lg ЭИД ₅₀ /мл		Разница в титре (72– 48) час, \lg ЭИД ₅₀ /мл
48 часов	72 часа	
5,4±0,6	8,2±0,1	2,8±0,6

Штамм А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) в опытах на развивающихся куриных эмбрионах обладает выраженным *ts* и *ca* фенотипом, идентичным фенотипу донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Фенотипические свойства вакцинного штамма не изменились после его пятикратного пассирования (таблица 7.16).

Таблица 7.16 - Фенотипические свойства вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm до и после его пассирования в куриных эмбрионах

Вирус	Титр, \lg ЭИД ₅₀ /мл при t°			RCT ₂₆	RCT ₄₀	Фенотип
	32°C	26°C	40°C			
А17	8,9	7,2	2,7	1,7	6,2	<i>ts, ca</i>
А/Калифорния/07/2009	8,7	2,7	7,5	6,0	1,2	<i>non-ts, non-ca</i>
А/17/Калифорния/2009/38 0-й пассаж	8,2	7,0	2,5	1,2	5,7	<i>ts, ca</i>
А/17/Калифорния/2009/38 5-й пассаж	8,3	7,0	2,2	1,3	6,1	<i>ts, ca</i>

7.2.3 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАКЦИННОГО ШТАММА A/17/КАЛИФОРНИЯ/2009/38 (H1N1)pdm

7.2.3.1 *Характеристика формулы генома.* Праймеры, подобранные для идентификации генов, принадлежащих пандемическому вирусу гриппа А (H1N1)pdm методом мультиплексной «да-нет»-ПЦР представлены в таблице В.7 приложения. Электрофорез ПЦР-продуктов, продемонстрировал соответствие реассортанта вакцинной формуле генома 6:2 (рис. 7.6 и 7.7).

7.2.3.2 *Генетическая стабильность кодирующих мутаций.* С помощью стандартного метода RFLP-PCR продемонстрирована идентичность мутаций во всех внутренних генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) до и после его пятикратного пассирования, в том числе в генах полимеразного комплекса (PB2, PB1, PA), ответственных за аттенуирующий фенотип (таблица 7.6).

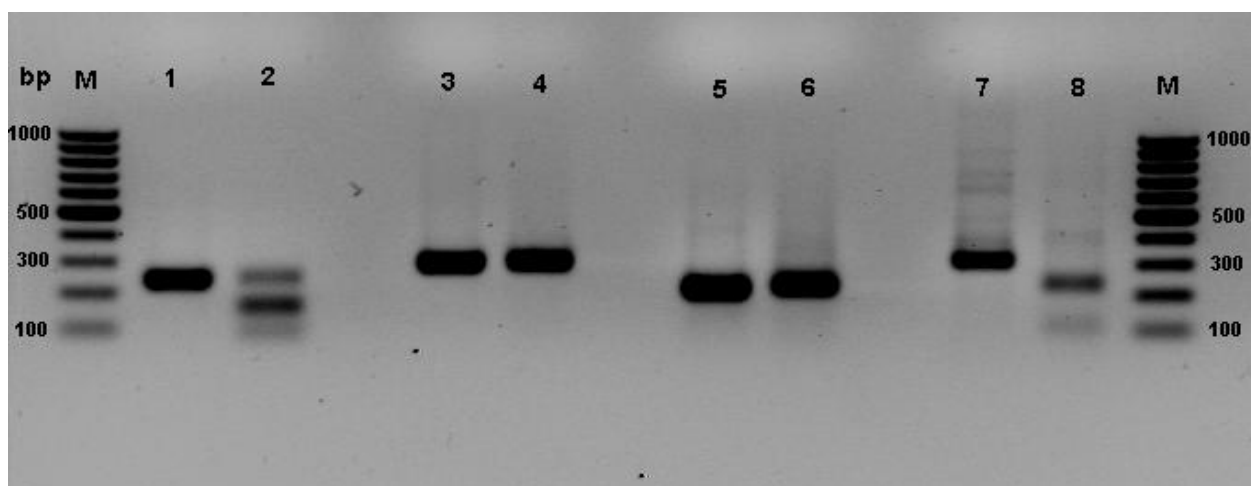


Рис. 7.6 - Определение принадлежности полимеразных генов реассортантного вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm методом RFLP-анализа

- 1 - PB2 (1459) RT-PCR продукт; 2 - PB2 (1459) RT-PCR продукт обработан рестриктазой *Mse I*;
 3 - PB1 (819) RT-PCR продукт; 4 - PB1 (819) RT-PCR продукт обработан рестриктазой *Hind III*;
 5 - PB1 (1795) RT-PCR продукт; 6 - PB1 (1795) RT-PCR продукт обработан рестриктазой *Bst XI*;
 7 - PA (107) RT-PCR продукт; 8 - PA (107) RT-PCR продукт обработан рестриктазой *Bam HI*;
 М - Маркер молекулярного веса пар оснований (bp, base pair).

Ген PB2 (1459) донора А17 режется рестриктазой *Mse I*,
 ген PA (107) донора А17 режется рестриктазой *Bam HI*,
 ген PB1 (819 и 1795) донора А17 не режется рестриктазами *Hind III* и *Bst XI*,
 что подтверждает наследование вакцинным штаммом генов PB2, PB1 и PA от донора аттенуации А17.

7.2.4 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАССОРТАНТНОГО ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ПАНДЕМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO

Изучение безвредности, острой токсичности и иммуногенности вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) в экспериментах на хорьках проводили в сотрудничестве с (ViroClinics, Роттердам, Нидерланды). Гриппозная инфекция у хорьков и у человека сходна по симптоматике, течению инфекции, распространению вируса в организме гуморального иммунного ответа. Для гриппозной инфекции хорьков характерны такие симптомы, как обильные выделения из носа и глаз, чихание, конъюнктивит, снижение аппетита, сонливость и лихорадка [409]. В результате проведенных исследований установлено, что интраназальное применение в прививочной дозе (7 lg ЭИД₅₀) живой гриппозной пандемической вакцины, приготовленной из штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm, не влияет на внешний вид, температуру тела (рис. 7.8), общее состояние и поведение животных, не оказывает негативного влияния на биохимические параметры крови и основные физиологические функции организма, не вызывает патоморфологических и иммуногистохимических изменений, что свидетельствует. Вакцинный штамм размножается только в верхних отделах дыхательного тракта, не проникая в легкие, мозг, кровь и другие внутренние органы подопытных животных (табл. 7.17 – 7.18).

Состояние животных при исследовании острой токсичности после подкожного введения вакцинного препарата свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности вакцины в дозах, превышающих прививочные для человека в десятки раз. Через 2 недели после интраназального заражения у хорьков зарегистрировано формирование иммунного ответа (табл. 7.19).

Таблица 7.17 - Результаты выделения пандемического штамма А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) и вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm из верхних дыхательных путей хорьков

Группа животных	Орган	День после заражения							
		1		3		5		7	
		PCR	MDCK (ПКЭ)	PCR	MDCK (ПКЭ)	PCR	MDCK (ПКЭ)	PCR	MDCK (ПКЭ)
Пандемический вирус	Нос	+	+	+	+	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	Трахея	+	+	+	+	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Вакцинный штамм	Нос	–	–	+	+	+	–	+	–
	Трахея	–	+	+	+	–	–	–	–

Таблица 7.18 - Результаты выделения пандемического штамма А/Нидерланды/602/2009 (H1N1)pdm и вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)

из внутренних органов хорьков

Животные, которым введен вирус	Носы		Легкие		Мозг		Селезенка		Кишечник	
	ПЦР	МДСК (РКЭ)	ПЦР	МДСК (РКЭ)	ПЦР	МДСК (РКЭ)	ПЦР	МДСК (РКЭ)	ПЦР	МДСК (РКЭ)
Пандемический вирус	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Вакцинный штамм	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

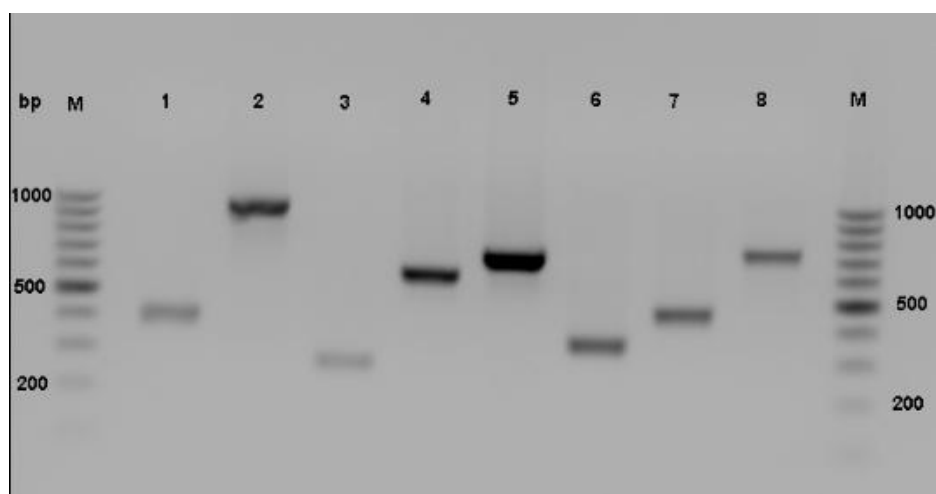


Рис. 7.7 - Анализ состава генома реассортантного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm. Электрофорез мультиплекс ПЦР (в варианте «да-нет»).

М-маркер молекулярного веса пар оснований (bp).

Амплификация генов с праймерами к донору аттенуации А17, дорожки:

- 1 - PB2 (A17); 5 - NP (A17);
 2 - PB1 (A17); 7 - M (A17);
 3 - PA (A17). 8 - NS (A17).

Амплификация генов с праймерами к вирусу А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm, дорожки:

- 4 - HA (H1)pdm;
 6 - NA (N1)pdm.

Таблица 7.19 - Иммунный ответ хорьков на введение вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm через 15 дней после заражения (суммарные данные)

Выделение вируса из носовых ходов	СГТ* антител в реакции	
	РТГА	Нейтрализации
Да	320	543

*СГТ- средний геометрический титр антител

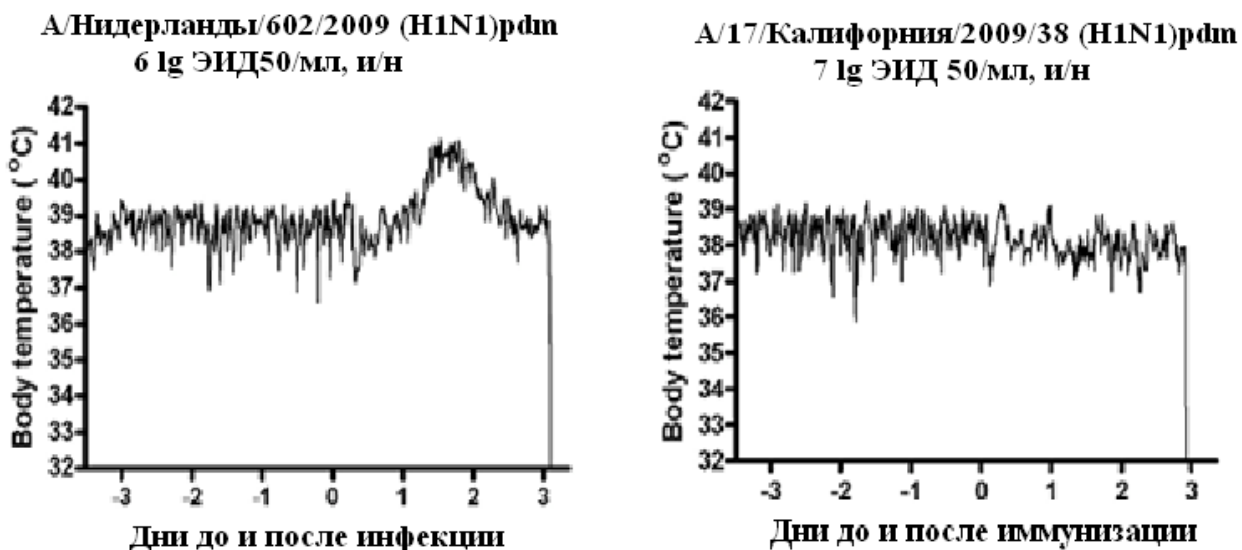


Рис. 7.8 - Динамика изменения температуры тела хорьков, зараженных интраназально пандемическим штаммом A/Нидерланды/602/2009 (H1N1) и пандемической вакциной из штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm. (Пандемический штамм A/Нидерланды/602/2009 (H1N1)pdm является A/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm-подобным вирусом). Обозначения: по оси абсцисс – дни после инфекции; по оси ординат – температура тела хорьков (°C).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведенных исследований продемонстрировано, что, штамм живой гриппозной вакцины A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1):

- Соответствует формуле генома 6:2;
- устойчив к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади, кролика, морской свинки, как и «дикий» родительский вирус;
- обладает *ts* и *ca* фенотипом, идентичным донору аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2);
- для достижения максимальных инфекционных титров требует 72 часов инкубации в развивающихся куриных эмбрионах при 32-33°C;
- генетически стабилен. Характеризуется постоянным набором ответственных за аттенуацию мутаций в генах, кодирующие внутренние белки, неизменным при пассировании;
- безвреден для хорьков при парентеральном и интраназальном введении;
- не обладает нейровирулентностью для хорьков;
- вызывает выраженный гуморальный иммунный ответ у хорьков.

Результаты доклинического изучения вакцинного штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) позволили перейти к испытаниям на взрослых добровольцах, а затем на детях в возрасте старше трех лет.

По результатам оценки безвредности и иммуногенности пандемическая живая гриппозная вакцина на основе штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm была зарегистрирована в Российской Федерации. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития выдано регистрационное удостоверение ЛСР–007988/09 Федеральному государственному унитарному предприятию «НПО «Микроген» МЗ РФ. Технология разработки вакцины получила лицензию ВОЗ для подготовки к пандемии в развивающихся странах [338].

7.3 РАЗРАБОТКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКОМУ ВИРУСУ СВИНОГО ГРИППА А/ИНДИАНА/10/11 (H3N2)_v И ЕГО ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная цель подготовки вакцин к вирусам гриппа с высоким пандемическим потенциалом, заключается в подборе оптимального метода разработки эффективной вакцины, широкого тестирования ее в доклинических и клинических исследованиях и создания коллекции вакцин, которые могут быть использованы в условиях экстренной необходимости. При получении вакцинных реассортантов к потенциально пандемическим вирусам гриппа успех зависит от взаимной констелляции генов филогенетически далеко отстоящих друг от друга родительских вирусов.

В соответствии задачей были подготовлены экспериментальные пандемические вакцинные штаммы и проведены их доклинические испытания, что позволило далее перейти к изучению их безопасности, репродуктивности и иммуногенности у привитых добровольцев.

С июля по август 2011 года в США были зарегистрированы 157 случаев заболеваний вызванных вирусом гриппа свиного происхождения А(H3N2)_v. Вирус А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v оказался реассортантом, содержащим, наряду с генами вируса гриппа свиней, М-ген от пандемического вируса А(H1N1)pdm09. Присутствие гена М вируса пандемического гриппа может быть фактором повышения трансмиссивности вируса людям. Отсутствие антител к вирусу свиного гриппа в человеческой популяции и усиление трансмиссивности вызывает обеспокоенность пандемическими потенциями подобного возбудителя [165].

7.3.1 ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСА СВИНОГО ГРИППА А/ИНДИАНА/10/2011 (H3N2)_v

Вирус А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v обладает выраженным *non-ts* и *non-ca* фенотипом. Разницы в титрах репродукции вируса при повышенной до 40°C в сравнении с оптимальной не

наблюдалось. При 25°C редукция титра составила 5,7 lg ЭИД₅₀/мл по сравнению с титром при оптимальной температуре (табл. 7.20).

Исследование чувствительности к термостабильным ингибиторам неиммунных сывороток крови лошади, морской свинки, крысы и кролика показало, что вирус свиного гриппа чувствителен к ингибиторам всех исследованных видов сывороток. Обработка сывороток RDE эффективно удаляет неспецифические ингибиторы вируса А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v (табл. 7.20). Вирус В/Висконсин/1/10 использован в качестве ингибиторочувствительного, а донор аттенуации А17 – в качестве ингибиторостойчивого контроля.

Таблица 7.20 - Чувствительность вирусов гриппа к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови животных в РТГА с куриными эритроцитами

Вирус	РТГА ¹ с нормальной сывороткой крови, обработанной							
	морской свинки		крысы		кролика		лошади	
	80°C, 10 мин	RDE	80°C, 10 мин	RDE	80°C, 10 мин	RDE	80°C, 10 мин	RDE
А17	0	0	0	0	0	0	0	0
В/Висконсин/1/10	1280	0	905	0	640	80	761	0
А/Индиана/10/2011	2560	0	1076	0	269	0	4305	0

¹Средний геометрический титр антител.

7.3.2 ПОДГОТОВКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСА СВИНОГО ГРИППА А (H3N2)_v МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ РЕАССОРТАЦИИ

Вакцинный штамм А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v получен методом классической генетической реассортации эпидемического вируса А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). РКЭ инфицировали смесью родительских вирусов в эквивалентных инфекционных дозах, последующую селекцию клонов с формулой генома 6:2 проводили при пониженной до 25°C температуре инкубации в присутствии антисыворотки (60 НАЕ) к донору аттенуации. Клоны дополнительно очищены четырьмя последовательными клонированиями методом предельных разведений под прессом антисыворотки к донору при пониженной (25°C – два клонирования) и оптимальной (32°C – два клонирования) температурах инкубации. Чистые клоны проверены по фенотипическим характеристикам (*ts*, *ca* фенотип) и по формуле генома на соответствие требованиям к вакцинному штамму.

7.3.3 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ А/17/ИНДИАНА/2011/72 (H3N2)_v В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Фенотипическая характеристика и стабильность биологических свойств вакцинного штамма. Параллельное титрование в РКЭ при разных температурах показало, что вакцинный штамм А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v обладает *ts* и *ca* фенотипом – его инфекционная активность при повышении температуры инкубации до 40°C – составляла менее 1.2 lg ЭИД₅₀/мл (40°C), разница в титре репродукции при пониженной до 25°C температуре в сравнении с оптимальной составляла 1,6 lg ЭИД₅₀/мл. По этим показателям вакцинный штамм существенно отличался от «дикого» родителя А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v и был идентичен донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), что свидетельствует о его безвредности для человека (табл. 7.21).

Стабильность фенотипических свойств реассортантного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v подтверждена после 5 пассажей при оптимальной температуре в РКЭ (табл. 7.21).

Таблица 7.21 - Фенотипический анализ вакцинного штамма А/17/Индиана/11/72 (H3N2)_v при репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

Вирусы	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /мл					Фенотип
	25°C	33°C	40°C	RCT ₂₅	RCT ₄₀	
<i>Эпидемический вирус</i>						
А/Индиана/10/2011 (H3N2) _v	3,5	9,2	9,2	5,7	0,0	<i>non-ts, non-ca</i>
<i>Донор аттенуации</i>						
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	7,7	9,2	<1,2	1,5	>8,0	<i>ts, ca</i>
<i>Реассортантный вакцинный штамм</i>						
А/17/Индиана/2011/72 (H3N2) _v исходный	8,0	9,6	<1,2	1,6	>8,4	<i>ts, ca</i>
А/17/Индиана/2011/72 (H3N2) _v пятый пассаж	8,1	9,8	<1,2	1,2	>8,6	<i>ts, ca</i>

Антигенная характеристика вакцинного штамма. Ответственный за антигенную специфичность поверхностный белок вакцинного штамма – гемагглютинин (НА) – в РТГА идентичен вирусу А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v, антисывороткой к которому полностью нейтрализуется. Второй ответственный за антигенную специфичность поверхностный белок вакцинного штамма – нейраминидаза (НА) – идентичен вирусу А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v по данным секвенирования.

7.3.4 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ А/17/ИНДИАНА/2011/72 (H3N2)_v К ВИРУСУ СВИНОГО ГРИППА

Анализ состава генома. Характеристика состава генома на соответствие вакцинной формуле генома 6:2 подтверждена методом «да-нет»–ПЦР анализа. Гены HA и NA вакцинного реассортанта принадлежат родительскому вирусу А/Индиана/10/2011 (H3N2)_v, гены, кодирующие внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), принадлежат донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Оценка генетической стабильности кодирующих мутаций. Сохранность у вакцинного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v всех аттенуирующих мутаций донора А17 (табл. 7.6) и до и после пятикратного пассирования в РКЭ продемонстрирована методом RFLP-анализа. Полное секвенирование генома исходного и пассированного вакцинного реассортанта подтвердило, что нуклеотидная последовательность вируса остается неизменной в результате проведения серийных пассажей.

Молекулярно–генетический анализ вакцинного штамма А/17/Индиана/11/72 (H3N2)_v.

Прямое секвенирование генов HA и NA реассортантного вируса А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v не выявило отличий в нуклеотидном составе от родительского вируса А/Индиана/10/2011(H3N2)_v. Все кодирующие нуклеотидные замены, охарактеризованные для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (табл. 7.6), присутствуют в генах внутренних и неструктурных белков реассортантного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v.

7.3.5 ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ШТАММА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ А/17/ИНДИАНА/11/72 (H3N2)_v В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

7.3.5.1 Безвредность для морских свинок.

Анализ острой токсичности вакцинного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)_v проводили при однократном введении морским свинкам 5 мл препарата подкожно в дозе 7,0 lg ЭИД₅₀/0,2мл. Животным контрольной группы вводили подкожно физиологический раствор. Ежедневно в течение 7 дней исследования проводился контроль общего состояния каждого животного.

Анализ подострой токсичности Морским свинкам вводили вирус интраназально по 100 мкл вируса в носовой ход, двукратно с 24–часовым интервалом. Животным контрольной группы интраназально вводили физиологический раствор. Контроль общего состояния каждого животного проводился ежедневно в течение 14 дней исследования.

Подкожное и интраназальное введение вакцинного штамма не вызывало гибели экспериментальных животных и не приводило к изменению их внешнего вида, поведения, не отражалось на потреблении ими пищи и воды, что свидетельствует о безвредности вакцинного препарата (табл. 7.22).

Таблица 7.22 - Результаты изучения безвредности вакцинного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v в экспериментах на морских свинках

Животные	Пол	Препарат	Путь введения	Выжило к последнему дню наблюдения
Морские свинки (острая токсичность)	Самцы	ВШ	п/к	10/10
	Самки	ВШ	п/к	10/10
	Самцы	Плацебо	п/к	10/10
	Самки	Плацебо	п/к	10/10
Морские свинки (подострая токсичность)	Самцы	ВШ	и/н	10/10
	Самки	ВШ	и/н	10/10
	Самцы	Плацебо	и/н	10/10
	Самки	Плацебо	и/н	10/10

Обозначения: ВШ – вакцинный штамм А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v; п/к – подкожное введение; и/н – интраназальное введение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Фенотипические характеристики (*non-ts/non-ca*) фенотип родительского вируса А/Индиана/10/2011 (H3N2)v, отсутствие после обработки RDE в сыворотке крови к донору неспецифических ингибиторов, к которым проявляет чувствительность вирус, способствовали эффективности получения вакцинных 6:2 реассортантов. Реассортация вируса гриппа свиней с донором аттенуации, который является вирусом гриппа человека, не привела к осложнениям, к которым следует быть готовым при скрещивании вирусов гриппа разных хозяев.

Штамм ЖГВ А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v характеризуется антигенной специфичностью вируса гриппа свиней А/Индиана/10/2011(H3N2)v, структурой генома 6:2, оптимальной для реассортантных вакцинных штаммов, характерной для донора аттенуации температурочувствительностью и холодоадаптированностью и безвредностью для лабораторных животных, что коррелирует с аттенуацией для человека.

Вакцинный штамм А/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v, полученный к потенциально пандемическому вирусу гриппа свиней, депонирован в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «Научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздравсоцразвития России (№ 2739 от 04.07.2013 г.)

7.4 РАЗРАБОТКА ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИМ ВИРУСАМ ГРИППА ПТИЦ А (H5N1) И ИХ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.4.1. ПОДГОТОВКА РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА ПТИЦ А (H5N1)

Целью настоящего раздела работы являлось создание штаммов ЖГВ к высоко патогенным потенциально пандемическим вирусам гриппа птиц сероподтипа А(H5N1) А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005 и А/индюк/Турция/1/2005, их доклиническое исследование и отбор наиболее перспективного кандидата для клинических исследований на добровольцах.

Классический путь получения реассортантных штаммов ЖГВ к высокопатогенным вирусам гриппа осложнен необходимостью проведения работы в особых условиях безопасности. Более того, из-за высокой патогенности вирусов для птиц невозможно проводить работу на развивающихся куриных эмбрионах. Поэтому для осуществления цели был разработан иной подход: в качестве источника генов HA и NA использовали вирусы гриппа, сконструированные методами обратной генетики (RG) для инактивированной вакцины.

Генно-инженерные вакцинные штаммы к вирусам гриппа птиц сероподтипа А(H5N1) представляют собой реассортанты (А/H5N1/PR8-RG), содержащие гены внутренних белков вириона от высоко репродуктивного штамма А/PR/8/34 (H1N1) (PR8), а HA и NA – от HPAI вируса гриппа птиц. Апатогенность сконструированных вирусов обусловлена тем, что в квиведж-сайте субъединицы HA H5 удален полиосновный мотив из четырех аминокислот, ответственный за патогенность вируса (подробнее см. в разделе 4.1).

Задача работы заключалась в том, чтобы приемами классической реассортации осуществить замену внутренних генов RG-реассортантов на гены донора аттенуации для ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

В скрещивании с донором аттенуации А17 использовали А/H5N1/PR8-RG штаммы: VN–PR, INDO–PR, NIBRG-23 (Turkey-PR) на основе вирусов гриппа птиц H5N1 А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005 и А/индюк/Турция/1/2005 соответственно.

Генетическую реассортацию вирусов проводили в РКЭ, следуя стандартному методу получения реассортантных вакцинных штаммов, описанному в главе 4. Скрещивание родительских вирусов осуществляли совместным введением их в куриный эмбрион при оптимальной температуре 32°C. Селекцию и клонирование реассортантов проводили в присутствии гипериммунной кроличьей сыворотки (в вариантах от 25 до 128 HAE) к донору

аттенуации A17. Селекцию *ca/ts* клонов осуществляли двукратно при пониженной температуре 25°C. Клонирования методом предельных разведений проводили при пониженной до 25°C температуре и двукратно при оптимальной температуре 32°C.

В результате приемов классической реассортации донора аттенуации A17 и генно-инженерных вирусов VN-PR и INDO-PR, шесть генов (PB2, PB1, PA, NP, M и NS), кодирующих внутренние белки вируса PR8 в геноме A/H5N1/PR8-RG, были замещены на соответствующие сегменты генома донора A17 (табл. 7.23).

Таблица 7.23 - Состав генома вакцинных реассортантов H5N2, полученных в развивающихся куриных эмбрионах

Вирус / Клон	Происхождение гена, кодирующего белок							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
VN-PR	PR8	PR8	PR8	VN	PR8	VN	PR8	PR8
A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17
Клон 65107	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
Клон 6592	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
Клон 6595	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
Клон 6596	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
Клон 6597	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
INDO-PR	PR8	PR8	PR8	INDO	PR8	INDO	PR8	PR8
A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17
Клон 4341	A17	A17	A17	INDO	A17	A17	A17	A17
Клон 4342	A17	A17	A17	INDO	A17	A17	A17	A17
Клон 479576	A17	A17	A17	INDO	A17	A17	A17	A17

Несмотря на несколько туров проведенных скрещиваний, десять реассортантов на основе вируса VN-PR и восемь реассортантов на основе вируса INDO-PR унаследовали NA от донора аттенуации (N2), формула генома 7:1. Помимо 7:1 реассортантов в группе VN-PR, три реассортанта имели ген, кодирующий белок PA от вируса PR8, а один унаследовал ген NS от PR8, т.е. имели формулу генома 5:3. Реассортанты с формулой генома 6:2 получить не удалось (табл. 7.24).

NIBRG-23, в отличие от вирусов VN-PR и INDO-PR, вообще не вступал в реассортацию с донором аттенуации A17 при использовании стандартной методики для получения штаммов ЖГВ. Было предпринято 12 различных вариаций метода классической реассортации. Для того, чтобы создать преимущество в наследовании внутренних генов от донора аттенуации, были применены различные модификации этапа совместного заражения куриных эмбрионов родительскими вирусами. Так, (1) исследовались различные соотношения NIBRG-23: A17 при скрещивании (от 1:1 до 1:10⁶), (2) различная последовательность инфицирования РКЭ

Таблица 7.24 - Результаты классической реассортации в куриных эмбрионах вирусов VN-PR и INDO-PR (H5N1) с донором аттенуации A17

Вирус/Клон	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17
VN-PR	PR8	PR8	PR8	VN	PR8	VN	PR8	PR8
INDO-PR	PR8	PR8	PR8	INDO	PR8	INDO	PR8	PR8
8 клонов	A17	A17	A17	INDO	A17	A17	A17	A17
10 клонов	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	A17
3 клон	A17	A17	PR8	VN	A17	A17	A17	A17
1 клон	A17	A17	A17	VN	A17	A17	A17	PR8

родительскими вирусами (одновременно, NIBRG-23 через 30 минут после A17, A17 через 30 минут после NIBRG-23), (3) применение различных концентраций антисыворотки к донору A17, (4) дополнительное введение в систему антисыворотки к вирусу A/PR8.

Несмотря на все перечисленные приемы, среди продуктов клонирования преимущественно определялся родительский вирус NIBRG-23. Из 234 изолированных клонов 209 были идентичны NIBRG-23, 9 клонов унаследовали от донора A17 единственный ген, кодирующий белок PA, 3 клон имели единственный ген NS от донора аттенуации, остальные 13 клонов были идентичны донору аттенуации A17.

Помимо этого, для получения реассортантов была использована частичная инактивация вируса воздействием светом ультрафиолетового (УФ) спектра. Вирус инактивировали до снижения титра на $6 \lg$ ЭИД₅₀/мл как описано в работе [480].

В результате скрещивания A17 и частично УФ-инактивированного NIBRG-23 в соотношении 100:1, было изолированы реассортанты C2, C4, D1, которые унаследовали несколько внутренних генов от донора аттенуации (табл. 7.25). В результате повторной реассортации A17 и «промежуточных» продуктов скрещивания C2, C4 и D1 (в соотношениях 1:1 и 10:1) были получены реассортанты с формулой генома 7:1, унаследовавшие от донора аттенуации A17 все гены, кодирующие внутренние белки, а также ген, кодирующий NA.

Нами было замечено, что во всех случаях наследования реассортантами гена NA N1 птичьего происхождения, в паре с N1 наследовался ген PB2/PR8.

Таблица 7.25 - Получение реассортантов между NIBRG–23 и донором аттенуации A17
(Реактивация в РКЭ. Двухэтапное скрещивание)

Вирус/Клон	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17	A17
NIBRG–23	PR8 ¹	PR8	PR8	TUR ²	PR8	TUR	PR8	PR8
<i>«Промежуточные реассортанты». Первый этап. (Скрещивание NIBRG–23, инактивированного УФ, и A17)</i>								
Клон В3	PR8	PR8	A17	TUR	PR8	TUR	PR8	PR8
Клон С2	PR8	A17	A17	TUR	PR8	TUR	PR8	PR8
Клон С4	A17	A17	A17	TUR	PR8	A17	PR8	A17
Клон D1	PR8	A17	A17	TUR	PR8	TUR	A17	PR8
<i>Второй этап. (Скрещивание «промежуточных реассортантов» и A17)</i>								
Клон С1593	A17	A17	A17	TUR	A17	A17	A17	A17
Клон С1598	A17	A17	A17	TUR	A17	A17	A17	A17
Клон D132	A17	A17	A17	TUR	A17	A17	A17	A17
Клон D133	A17	A17	A17	TUR	A17	A17	A17	A17

¹Ген унаследован от сконструированного методами обратной генетики реассортантного вируса NIBRG–23, 6 генов, кодирующих внутренние белки которого происходят от вируса A/PR/8/34;

²Ген унаследован от сконструированного методами обратной генетики реассортантного вируса NIBRG–23 (H5N1), гены HA и NA которого происходят от вируса гриппа птиц A/индюк/Турция/1/05 (H5N1).

Таким образом, в результате приемов классической реассортации в куриных эмбрионах вирусов VN–PR и INDO–PR и донора аттенуации удалось получить 7:1 реассортанты, содержащие ген, кодирующий гемагглютинин H5 птичьего происхождения, а остальные гены от донора аттенуации. Реассортанты с геном, кодирующим N1 NA птичьего происхождения получены не были.

Для пары вирусов NIBRG-23 (H5N1) и A17 метод классической реассортации, используемый для создания ЖГВ на основе сезонных вирусов гриппа человека, оказался неэффективным. С помощью приемов инактивации вируса NIBRG-23 (H5N1) и пошагового скрещивания промежуточных тройных (H5N1–H1N1–H2N2) реассортантов был получен вакцинный реассортант с формулой генома 7:1, который приобрел HA от вируса гриппа птиц (H5), остальные гены – от донора аттенуации. Все попытки перенести птичью N1 NA в геном реассортантов оказались неэффективны.

7.4.2 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА ПТИЦ А (H5N1) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Фенотипическая характеристика и стабильность биологических свойств вакцинных штаммов. Аттенуированный фенотип вакцинных реассортантов подтвержден на основании сохранности характерных для донора А17 маркеров аттенуации – температурочувствительности и холодоустойчивости при титровании в РКЭ (табл. 7.26). По исследуемым характеристикам вакцинные клоны существенно отличались от родительских *non-ts/non-ca* вирусов H5N1-PR и обладали сходным *ts/ca* фенотипом с 6:2 реассортантом VN/H5N1-RG-ЖГВ, полученным генно-инженерными методами. Стабильность фенотипических свойств реассортантных штаммов подтверждена после 5 пассажей в РКЭ при оптимальной температуре.

7.4.3 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА ПТИЦ А(H5N1)

7.4.3.1 Анализ состава генома. Характеристику состава генома вакцинных клонов на основе вирусов гриппа птиц А(H5N1) осуществляли методом мультиплекс «да-нет» ПЦР. Праймеры, позволяющие дифференцировать внутренние гены вируса А/PR8/8/34 (H1N1) от внутренних генов донора аттенуации, а НА и NA птичьего происхождения – от НА и NA донора аттенуации представлены в таблице В.8 Приложения. Установлена формула генома реассортантов 7:1 с наследованием от вирусов гриппа птиц NIBRG-23, VN-PR и INDO-PR (H5N1) единственного гена H5 НА. Гены, кодирующие NA N2 и внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), принадлежат донору аттенуации А17.

7.4.3.2 Генетическая стабильность кодирующих мутаций. Идентичность мутаций во всех внутренних генах, в том числе в генах полимеразного комплекса (PB2, PB1, PA), ответственных за аттенуированный фенотип, у донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вакцинных H5N2 реассортантов до и после их пятикратного пассирования, подтверждена с помощью стандартного метода RFLP-PCR (таблица 7.6).

Для доклинических исследований на животных были выбраны вакцинные штаммы А/индюк/Турция/05/133 (t/T/H5N2) на основе клона D133 и А/Вьетнам/04/65107 (VN/H5N2) на основе клона 65107

7.4.3.3 Секвенирование генома вакцинных реассортантов. Проведено полное секвенирование генома вакцинных реассортантов t/T/H5N2 и VN/H5N2.

Подтверждено отсутствие последовательностей из четырех основных аминокислот, ответственных за высокую вирулентность НРАIV, что еще более усиливает аттенуированные свойства реассортантов для ЖГВ. Секвенирование гена NA реассортантов t/T/H5N2 и VN/H5N2 подтвердило принадлежность гена донору аттенуации A17. Выявлено четыре приобретенных мутации у реассортанта VN/H5N2 в генах PB1 (1), HA (2) и NA (1). У реассортанта t/T/H5N2 выявлена единственная мутация в гене NA (табл. 7.27). Интересно, что мутация в гене NA

Таблица 7.26 - Фенотипический анализ вакцинных реассортантов с формулой генома 7:1 на основе штаммов A/H5N1/RG-PR8 при репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

Родительские вирусы и 7:1 клоны А (H5N2)		Титр вируса при 33°C (lg ЭИД ₅₀ /мл)	Редукция титра вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл)				Фенотип
			RCT ₂₅	RCT ₃₈	RCT ₃₉	RCT ₄₀	
A17(H2N2) донор <i>att</i>		9,2	2,5	6,0	7,0	7,5	<i>ts, ca</i>
NIBRG-23(H5N1)		6,2	4,0	0	4,7	6,2	<i>non-ts, non-ca</i>
клон	D133	8,7	1,5	5,7	8,7	8,7	<i>ts, ca</i>
	C1593	10,7	2,0	5,7	9,0	10,7	<i>ts, ca</i>
	C1598	11,2	3,0	5,5	9,7	10,7	<i>ts, ca</i>
	D 132	11,2	3,0	5,5	9,2	10,2	<i>ts, ca</i>
VN-PR (H5N1)		7,7	4,0	1,0	7,7	7,7	<i>non-ts, non-ca</i>
клон	65107	9,2	1,5	7,0	9,2	9,2	<i>ts, ca</i>
	6592	8,7	1,5	7,0	8,7	8,7	<i>ts, ca</i>
	6595	8,7	2,0	7,0	8,2	8,7	<i>ts, ca</i>
	6596	9,2	2,0	6,5	9,2	9,2	<i>ts, ca</i>
	6597	8,7	1,5	7,0	8,7	8,7	<i>ts, ca</i>
INDO-PR (H5N1)		8,2	4,5	0	0	0	<i>non-ts, non-ca</i>
клон	4341	8,2	2,5	6,5	5,0	8,2	<i>ts, ca</i>
	4342	10,2	3,0	6,0	5,0	9,7	<i>ts, ca</i>
	479576	8,7	2,5	7,5	5,0	8,7	<i>ts, ca</i>
VN/H5N1-RG-ЖГВ		8,7	1,5	6,2	8,7	8,7	<i>ts, ca</i>

Таблица 7.27 – Нуклеотидные и аминокислотные различия между предшественником донора аттенуации А/Ленинград/134/57(Н2N2), донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) и вакцинными штаммами Н5-ЖГВ

Ген	Нуклеотид						Белок	Аминокислотный остаток					
	№	Лен wt ¹	A17 ²	VN/H5N1-RG ЖГВ ³	VN/H5N2 ЖГВ ⁴	t/T/H5N2 ЖГВ ⁵		№	Лен wt	A17	VN/H5N1-RG ЖГВ	VN/H5N2 ЖГВ	t/T/H5N2 ЖГВ
PB2	1459	G	T	T	T	T	PB2	478	Val	Leu	Leu	Leu	Leu
PB1	360	G	A	A	A	A	PB1	112	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
	819	G	T	T	T	T		265	Lys	Asn	Asn	Asn	Asn
	1795	G	A	A	A	A		591	Val	Ile	Ile	Ile	Ile
	*1011	A	A	A	G	A		329	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
PA	107	T	C	C	C	C	PA	28	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro
	222	T	C	C	C	C		66	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
	1045	G	T	T	T	T		341	Val	Leu	Leu	Leu	Leu
NA	*765	G	G	G	T	T	NA	249	Arg	Arg	Arg	Ile	Ile
	1116	T	C	C	C	C		366	Ile	Thr	Thr	Thr	Thr
M	68	A	G	G	G	G	M1	15	Ile	Val	Val	Val	Val
	457	T	G	G	G	G		144	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu
NS	798	G	A	A	A	A	NS2	100	Met	Ile	Ile	Ile	Ile
HA	*50	-	-	T	C	-	HA	8	-	-	Phe	Leu	-
	*417	-	-	T	C	-		130	-	-	Ile	Thr	-

Обозначения здесь и в следующих таблицах и рисунках раздела:

¹Лен wt - «дикий» предшественник донора аттенуации А/Ленинград/134/57 (Н2N2);

²A17 – донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2);

³VN/H5N1-RG ЖГВ - вакцинный кандидат А/17/Вьетнам/1203/04-RG (H5N1);

⁴VN/H5N2 ЖГВ - вакцинный кандидат А/17/Вьетнам/04/65107 (H5N2);

⁵t/T/H5N2 ЖГВ - вакцинный кандидат А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2).

*Добавочные мутации у вакцинных штаммов Н5N2 ЖГВ.

G-765-T была одинаковой для обоих вакцинных реассортантов. Она привела к аминокислотной замене Arg-249-Phe. Поскольку мутация является общей для обоих реассортантов, можно предполагать общую функциональную значимость. Мутация не связана с приобретением устойчивости к препаратам ингибиторам нейраминидазы, что было проверено с группой противовирусных препаратов этого ряда [344]. Не исключена не выявленная ранее гетерогенность гена NA донора аттенуации по этой позиции. Возможно также, что мутация появилась как следствие функциональной подстройки нейраминидазы вируса человека к гемагглютинирующему вирусу птичьего хозяина. Мутация не меняет антигенность вирусов, также как и мутации в гене NA реассортанта VN/H5N2: T-50-C, которая привела к замене в области сигнального пептида NA0 и удаляется при расщеплении NA, мутация T-417-C связана с аминокислотной заменой Phe-114-Thr, которая расположена далеко от рецепторного и антигенного сайтов вируса [507]. Мутация в гене PB1¹⁰¹¹ некодирующая.

Таким образом, секвенирование обоих реассортантов не выявило существенных изменений, которые влияют на иммуногенные или аттенуирующие свойства вакцинных штаммов.

7.4.4 ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ К ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСАМ ГРИППА ПТИЦ А(Н5N1) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

ФГУП НПО «Микроген» была произведена вакцины гриппозная живые моновалентные (ЖГВ H5N2) на основе вакцинных штаммов A/17/индюк/Турция/05/133 (t/T/H5N2 ЖГВ), A/17/Вьетнам/04/65107 (VN/H5N2 ЖГВ) и A/17/Вьетнам/1203/04-RG (VN/H5N1-RG ЖГВ). Доклинические исследования ЖГВ H5N2 выполнялись курах и хорьках. Исследования безопасности, иммуногенной и протективной активности вакцинного препарата при однократном и двукратном введении хорькам были проведены в Университете Питсбурга (г. Питсбург, США). Исследования безопасности вакцинного препарата при введении курам проводили в Юго-Восточной исследовательской лаборатории по птицеводству (г. Афины, США).

Оценку проводили по следующим параметрам: общее состояние животных, изменение массы тела и температуры тела иммунизированных животных (для хорьков), наличие поствакцинального иммунного ответа антител в сыворотках, формирование защитного иммунитета против «диких» вирусов гриппа птиц, относящихся к серотипу H5N1.

Оценку безопасности на курах проводили для подтверждения отсутствия остаточной вирулентности и опасности для сельского хозяйства.

Исследование безвредности в экспериментах на курах. Индекс патогенности у кур после введения ЖГВ H5N2 соответствовал 0.00. В течение 10 суток наблюдения ни у одного животного не было зарегистрировано признаков развития гриппозной инфекции (табл. 7.28), что свидетельствует о полной безвредности для кур препаратов ЖГВ H5N2.

На третьи сутки после интраназального введения в дозе $5.9 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1$ мл ЖГВ H5N2 не вызывала развития инфекции, вакцинный вирус не был выделен из смывов ВДП и из клоаки, при этом не наблюдалось выделения вируса и из тканей легких, почек, сердца и головного мозга. На 14–е сутки после интраназального введения не зарегистрировано сероконверсий (табл. 7.28). Вакцинные препараты были безопасны для кур, а высокая температура тела кур ($\sim 41,5^{\circ}\text{C}$) не способствовала приживляемости *ts/ca* вакцинных штаммов.

Исследование безвредности в экспериментах на хорьках. У хорьков, которым и/н была введена одна доза каждой из тестируемых ЖГВ H5N2, не наблюдалось выделения вируса из легких и носовых ходов, также как у хорьков иммунизированных вакциной А/Калифорния/2009/39 H1N1) к пандемическому вирусу гриппа, которая использовалась как безвредный контроль (табл.7.29). При этом и/н заражение патогенными вирусами А/индюк/Турция/1/2005 и А/Вьетнам/1194/2004 приводило к активной репродукции вирусов в носях и легких с развитием в легких тяжелых поражений.

Изучение динамики изменения веса и температуры (рис. 7.9) тела не выявили различий в этих показателях по сравнению с контрольными животными, получившими препарат плацебо.

Исследования иммуногенности и протективной активности в экспериментах на хорьках. Вакцинация хорьков ЖГВ H5N2 приводила к формированию широкого спектра перекрестно реагирующих антител против вирусов своего и эволюционно предшествующих клейдов (табл.7.30) Наибольший спектр перекрестно реагирующих антител демонстрировал штамм t/T/H5N2 ЖГВ.

При этом все исследованные H5–ЖГВ защищали хорьков от челленджа HPAIV H5N1 в отличие от хорьков, при первичном заражении получивших препарат плацебо, которые проявляли явные признаки заболевания, выделяли «дикий» вирус из легких и погибали на 5-6 день (табл. 7.31, рис 7.10). У животных, иммунизированных ЖГВ H5N2, формировался уровень гуморальных антител, достаточный для защиты от последующего заражения вирусом «дикого» типа, на третий день после челленджа вирус в легких у них не обнаруживался. Выделение «дикого» вируса отмечено только в группе, при первичном заражении получившей плацебо.

Никаких клинических симптомов не было выявлено у хорьков, вакцинированных ЖГВ H5N2 (комплексные наблюдения включали оценку двигательной активности, чихание, летаргию, обонятельные и зрительные нарушения, диарею, неврологические симптомы, изменения веса, температуры тела и др.) (рис. 7.10). В группе животных, получившей плацебо и

зараженной диким вирусом H5N1 наблюдались выраженные клинические симптомы и гибель животных к 6 суткам после заражения.

Таблица 7.28 - Оценка безвредности и инфекционной активности ЖГВ H5N2 при интраназальном введении курам в дозе 5.9 lg ЭИД₅₀/0,1 мл

Развитие инфекции	Летальность	Выделение вируса на 3-и сутки после интраназальной инокуляции						Индекс патогенности на 10-е сутки	Сероконверсии на 14-е сутки (ИФА)
		Смывы		Выделение из тканей					
		ВДП	клоака	легкие	сердце	почки	головной мозг		
0/8	0/8	0/10	0/10	0/2	0/2	0/2	0/2	0/10	0/8

Таблица 7.29 – Проявления аттенуированного фенотипа ЖГВ H5N2 в экспериментах на хорьках после интраназального введения

Вирус	Доза вируса, lg ЭИД ₅₀ /хорек	День р.і.	Выделение вируса (lg БОЕ/г)		Оценка поражений легких: индивидуальные (средние)
			Легкие	Носы	
VN/H5N2 ЖГВ	6.0	3	0	0	0; 1; 0 (0.3)
		5	0	0	2; 2; 2 (2.0)
	7.0	3	0	0	0; 0; 0 (0)
		5	0	0	3; 2; 3 (2.7)
VN/H5N1-RG ЖГВ	6.0	3	0	0	0; 0; 0 (0)
		5	0	0	0; 0; 2 (0.7)
	7.0	3	0	0	0; 0; 2 (0.7)
		5	0	0	0; 0; 2 (0.7)
t/T/H5N2 ЖГВ	6.0	3	0	0	2; 0; 0 (0.7)
		5	0	0	0; 0; 0 (0)
	7.0	3	0	0	0; 2; 2 (1.3)
		5	0	0	0; 0; 2 (0.7)
А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1) HPAIV	7.0	3	4.15	4.24	5; 5; 5 (5.0)
		5	3.89	4.17	5; 5; 5 (5.0)
А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) HPAIV	7.0	3	4.36	4.20	5; 5; 5 (5.0)
		5	4.25	3.89	5; 5; 5 (5.0)
А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) ЖГВ	7.0	3	0	0	0; 0; 0 (0)
		5	0	0	0; 0; 0 (0)
Плацебо (PBS)	NO	3	0	0	0; 0; 0 (0)
		5	0	0	0; 0; 0 (0)

Репродукцию вирусов в тестируемых образцах оценивали по образованию бляшек в культуре клеток MDCK. Каждая группа включала 3-х животных. Гистологические параметры оценки: 0 – нет видимых изменений, 1 – минимальные, 2 – легкие, 3 – средние, 4 – сильные, 5 – тяжелые.

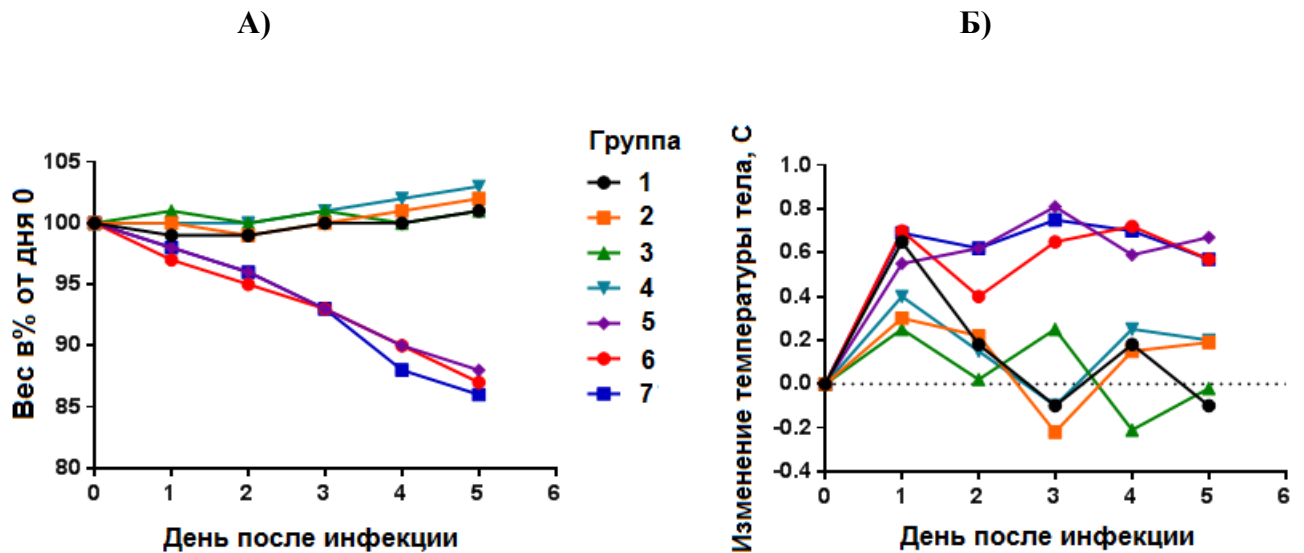


Рисунок 7.9 - Динамика изменения А) веса тела хорьков и Б) температуры тела хорьков, вакцинированных ЖГВ H5N2.

Пунктиром обозначена базовая линия температурной нормы.

6 животных в каждой группе были интраназально иммунизированы (заражены) дозой вируса:

- 1 - VN/H5N1-RG ЖГВ, 7 lg ЭИД₅₀;
- 2 - VN/H5N2 ЖГВ, 7 lg ЭИД₅₀;
- 3 - t/T/ H5N2, 7 lg ЭИД₅₀;
- 4 - плацебо (PBS);
- 5 - А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1), 7 lg ЭИД₅₀;
- 6 - А/индюк/Турция/1/2005(H5N1), 6 lg ЭИД₅₀;
- 7 - А/индюк/Турция/1/2005(H5N1), 7 lg ЭИД₅₀.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Эксперименты на хорьках и курах продемонстрировали безвредность, иммуногенность и протективную активность ЖГВ H5N2. Вакцинация живой гриппозной вакциной из штамма H5N2 вызывала у иммунологически наивных подопытных хорьков формирование иммунного ответа широкого спектра действия и защищала их от последующего заражения высокопатогенным вирусом гриппа птиц H5N1. ЖГВ H5N2, на основе 7:1 реассортантов, в состав которых входит единственный ген НА H5 высокопатогенных вирусов гриппа птиц, по протективным и иммуногенным характеристикам не отличались от RG вакцинного штамма с формулой генома 6:2, т.е. включающего два антигена HPAIV НА H5 и НА N1.

Доклиническая характеристика экспериментальной серии ЖГВ H5N2 позволила перейти к клиническим исследованиям на ограниченном контингенте волонтеров.

Таблица 7.30 - Иммуногенность H5N2 ЖГВ в исследованиях на хорьках

Объект тестирования	Неделя после вакцинации	Антиген H5N1 для РТГА (СГТ ¹)					
		VN ² (клайд 1)	INDO ³ (клайд 2.1)	А/Индюк ⁴ (клайд 2.2)	А/Гусь ⁵ (клайд 2.2)	А/Лебедь ⁶ (клайд 2.2)	А/Аньхой ⁷ (клайд 2.3)
VN/H5N2 ЖГВ (клайд 1)	0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	4	40.0	11.2	10.0	10.0	14.1	10.0
	6	403.1	10.0	20.0	20.0	31.8	17.8
	6/4	10.1⁸	1.2	2.0	2.0	2.3	1.8
VN/H5N1-RG ЖГВ (клайд 1)	0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	4	50.4	11.2	10.0	10.0	22.5	10.0
	6	285.1	35.6	14.1	14.1	127.0	17.8
	6/4	5.7	3.2	1.4	1.4	5.6	1.8
t/T/H5N2 ЖГВ (клайд 2.2)	0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	4	127.0	10.0	12.6	14.1	10.0	10.0
	6	508.0	44.9	127.0	113.1	40.0	22.5
	6/4	4.0¹	4.5	10.1	8.0	4.0	2.3
PBS	0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	6	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	6/4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Доза вакцинации: 7.0 Ig ИД₅₀/хорек. Образцы крови собирали на 28 день (4 недели) и 42 день (6 недель) после иммунизации.¹Средний геометрический титр антител; каждая группа включала 6 животных; ²А/Вьетнам/1203/04 (H5N1); ³А/Индонезия/5/05 (H5N1); ⁴А/индюк/Турция/1/05 (H5N1); ⁵А/горный гусь/Монголия/1/2005 (H5N1); ⁶А/лебедь-кликун/Монголия/244/05 (H5N1); ⁷А/Аньхой/1/05 (H5N1).
⁸Четырехкратный и более прирост титров антител против НА вируса в сыворотках хорьков между первым (4 недели) и вторым (6 недель) образцами принимали за сероконверсию.

Таблица 7.31 - Выделение высокопатогенных вирусов гриппа птиц из респираторного тракта иммунизированных H5-ЖГВ хорьков после челленджа соответствующим HPAI вирусом H5N1

иммунизация ЖГВ, (7 lg ЭИД ₅₀ /хорек) / плацебо контроль	челендж HPAIV A(H5N1) / PBS								
	A/Вьетнам/1194/2004			A/индюк/Турция/1/2005			PBS		
	Легкие (Д 3)	Нос (Д 3)	Носовые смывы (Д 3 / Д 5) ³	Легкие (Д 3)	Нос (Д 3)	Носовые смывы (Д 3 / Д 5) ³	Легкие (Д 3)	Нос (Д 3)	Носовые смывы (Д 3 / Д 5) ³
VN/H5N2 ЖГВ	0	1.40	2.80 / 0	н.и.			0	0	0
VN/H5N1-RG ЖГВ	0	1.52	2.88 / 0	н.и.			0	0	0
t/T/H5N2 ЖГВ	н.и.			0	1.45	2.23 / 0	0	0	0
Плацебо (PBS)	4.86	5.10	5.96 / 4.84	4.82	4.96	5.80 / 4.53	0	0	0

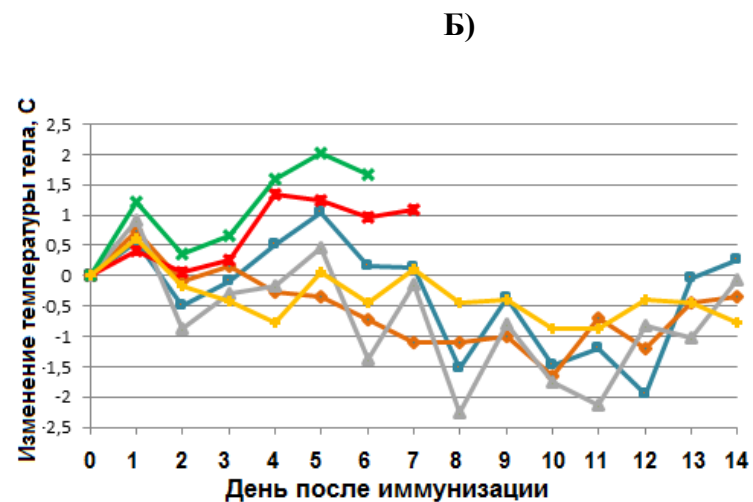
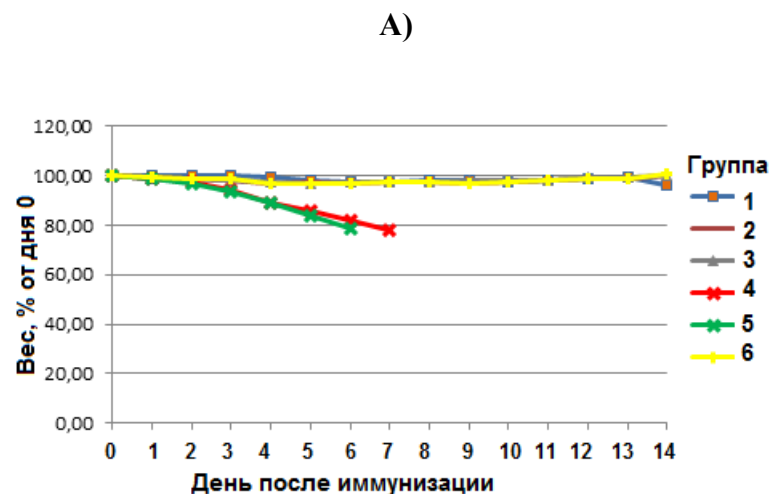


Рисунок 7.10 - Динамика изменения А) веса тела хорьков и Б) температуры тела хорьков, иммунизированных ЖГВ H5N2, после челленджа летальной дозой HPAIV H5N1.

6 животных в каждой группе были интраназально иммунизированы двумя дозами (7 lg ЭИД₅₀) ЖГВ-Н5 с интервалом 28 дней и через 42 дня заражены HPAIV H5N1 (6 lg ЭИД₅₀). Контрольные неиммунизированные животные получили препарат плацебо (PBS):

- 1 – иммунизированы VN/H5N2 ЖГВ, челлендж HPAIV H5N1 А/Вьетнам/1194/2004;
- 2 - иммунизированы VN/H5N1-RG ЖГВ, челлендж HPAIV H5N1 А/Вьетнам/1194/2004;
- 3 - иммунизированы t/T/ H5N2, 7 lg ЭИД₅₀; челлендж HPAIV H5N1 А/индюк/Турция/1/2005;
- 4 - иммунизированы плацебо (PBS), челлендж HPAIV H5N1 А/Вьетнам/1194/2004;
- 5 – иммунизированы плацебо (PBS), челлендж HPAIV H5N1 А/индюк/Турция/1/2005;
- 6 - иммунизированы плацебо (PBS), челлендж плацебо (PBS).

7.4.5 ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ЖГВ К ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКОМУ ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ А/ИНДЮК/ТУРЦИЯ/05/133 (H5N2) ОТ ПРИВИТЫХ ВОЛОНТЕРОВ

В настоящем разделе работы представлены результаты изучения генетической стабильности клинических изолятов, полученных от взрослых здоровых волонтеров, привитых ЖГВ к НРАІ потенциально пандемическому вирусу А/индюк/Турция/1/05 (H5N1) в двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом клиническом исследовании.

Использовали живую моновалентную гриппозную вакцину (H5-ЖГВ) на основе реассортантного вакцинного штамма (H5-ВШ) А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2), подготовленную ФГУП НПО «Микроген» по действующей технологии.

Сорок здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 18 до 49 лет были рандомизированы в соотношении 3:1 для иммунизации H5-ЖГВ или плацебо.

Выделение вакцинного вируса осуществляли в результате культивирования в РКЭ носовых мазков, полученных от привитых волонтеров.

Репродуктивность вакцинного вируса в носоглотке оценивали по результатам его выделения в РКЭ, зараженных материалом носовых мазков вакцинированных лиц.

От волонтеров было выделено 16 изолятов, все – только в первый день после вакцинации. При этом вакцинный вирус не был обнаружен ни у одного добровольца группы плацебо, что свидетельствует об отсутствии трансмиссивных потенциалов у вакцины H5-ЖГВ.

Изоляты сохранили все аттенуирующие мутации, описанные для внутренних генов донора А17 (табл. 7.6). Эти данные указывают на высокий уровень генетической стабильности вакцинного вируса после репликации в организме человека.

Что касается гена, кодирующего НА, то у вакцины H5-ЖГВ его последовательность оказалась неоднородной по двум позициям: аминокислотные остатки 145 (НА1) и 64 (НА2). В следствие этого, 7 из 16 вакцинных изолятов содержали Arg в обеих позициях, а у остальных изолятов в этих положениях присутствовал Lys (табл. 7.32, рис. 7.11). Кроме того, у трех вакцинных изолятов отмечена аминокислотная замена Glu → Lys в позиции 143 (НА2). Важно отметить, что H5-ВШ, который был использован для производства вакцины H5-ЖГВ, был однородным в положениях Arg¹⁴⁵ (НА1), Arg⁶⁴ (НА2) и Glu¹⁴³ (НА2), и не отличался от вируса NIBRG-23.

Замена Arg → Lys едва ли оказывает значимое влияние на свойства НА, поскольку эти аминокислоты имеют сходные характеристики: обе являются основными и положительно заряженными. Свойства аминокислот Glu и Lys отличаются значительно, однако, мутация

Таблица 7.32 - Мутации в молекуле гемагглютинина изолятов от привитых лиц и клонов вакцинного вируса Н5-ЖГВ, полученных после клонирования препарата Н5-ЖГВ

Изолят / клон	а.к. ² (HA1)	а.к. (HA2)	а.к. (HA2)
	145	64	143
<i>Вирусы</i>			
NIBRG-23	Arg	Arg	Glu
Н5-ВШ ¹	Arg	Arg	Glu
Н5-ЖГВ ²	Arg/Lys	Arg/Lys	Glu
<i>Изоляты вакцинного вируса Н5-ЖГВ от привитых лиц</i>			
№№ 1-7	Arg	Arg	Glu
№№ 8-13	Arg	Arg	Glu
№№ 14-16	Lys	Lys	Lys
<i>Группа (а). Клоны вакцинного вируса Н5-ЖГВ, выделенные в результате клонирования в РКЭ исходного препарата Н5-ЖГВ</i>			
№№ 17-20	Arg	Arg	Glu
№№ 21-31	Lys	Lys	Glu
<i>Группа (б). Клоны вакцинного вируса Н5-ЖГВ, выделенные в результате клонирования препарата Н5-ЖГВ, после 10 предварительных пассажей в РКЭ</i>			
№№ 32-43	Lys	Lys	Glu

¹Вакцинный штамм ЖГВ А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2);

²подготовленная из Н5-ВШ ФГУП НПО «Микроген» пандемическая ЖГВ, которая использовалась в клинических испытаниях;

³аминокислотный остаток.

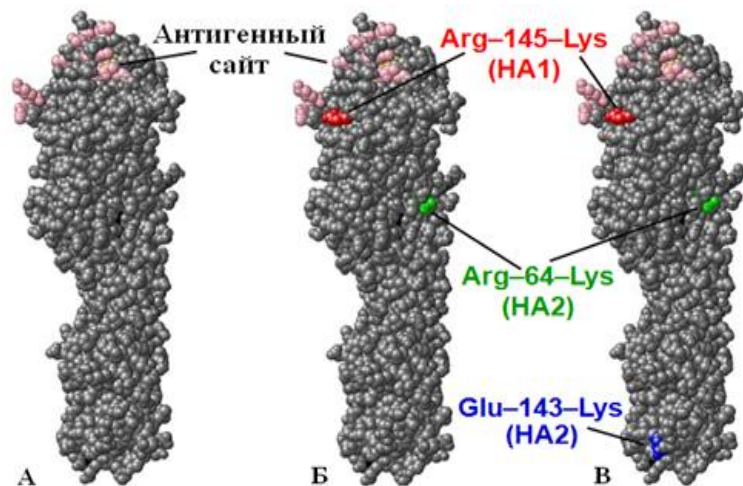


Рисунок 7.11 - Локализация аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина клинических изолятов, полученных от волонтеров, вакцинированных Н5-ЖГВ.

Структурная модель гемагглютинина построена на основе кристаллической структуры гемагглютинина вируса А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) [594] с использованием программы RasMol, версия 2.7.5. Розовый цвет – антигенный сайт; красный цвет – Arg-145-Lys в HA1; зеленый цвет – Arg-64-Lys в HA2; синий цвет – Gly-143-Lys в HA2. (А). Гемагглютинин родительского вируса NIBRG-23, вакцинного штамма Н5-ВШ и изолятов №№1-7. (Б). Гемагглютинин изолятов №№8-13. (В). Гемагглютинин изолятов №№14-16.

Glu-143-Lys находится в субъединице HA2 и не должна влиять на антигенные, иммуногенные и рецепторные характеристики вакцинного препарата.

Обнаруженные нами две мутации в гемагглютинине Arg-145-Lys (HA1) и Arg-64-Lys (HA2) могут быть следствием адаптации вакцинного вируса к репродукции в РКЭ, а мутация Gly-143-Lys – либо проявившейся минорной заменой, которую чувствительность метода секвенирования не позволила обнаружить, либо результатом адаптации вируса к репликации у человека. Чтобы понять природу этих мутаций, H5-ЖГВ из ампулы (а) была сразу клонирована методом предельных разведений; (б) до клонирования прошла 10 последовательных пассажей в РКЭ. Всего было выделено 27 клонов, 15 из группы (а) и 12 – из группы (б).

Было установлено, что 11 из 15 клонов, изолированных непосредственно из ампулы H5-ЖГВ, содержали две добавочные кодирующие мутации в HA, которые были обнаружены и у части изолятов от привитых добровольцев – Arg-145-Lys (HA1) и Arg-64-Lys (HA2). Четыре клона не содержали дополнительных мутаций и были идентичны H5-VIII.

После 10 пассажей препарата H5-ЖГВ в РКЭ все 12 клонов уже содержали обе мутации в молекуле HA (табл. 7.32). Наиболее вероятно, что эти аминокислотные замены появились во время пассажей в РКЭ и представляют собой адаптивные мутации «круга хозяев». Замена же Glu-143-Lys (HA2), обнаруженная у трех изолятов от привитых, не проявилась ни в одном из 27 клонов вакцинного препарата. Возможно, что эта мутация возникла в результате адаптации вакцинного вируса к репродукции у человека.

Вне зависимости от наличия или отсутствия добавочных мутаций в HA все 16 изолятов от привитых лиц обладали *ts/ca* фенотипом, характерным для донора аттенуации (табл. 7.33). H5-VIII и H5-ЖГВ не отличались от донора A17 по фенотипическим свойствам. Разница в титрах вирусов при температурах 33°C/40°C составляло 8.2–10.7 lg ЭИД₅₀/мл, а при 33°C/25°C составляло 1.5–3.0 lg ЭИД₅₀/мл. Таким образом, изоляты вакцинного вируса от привитых лиц сохранили фенотипические характеристики, присущие донору аттенуации – холодоустойчивость и температурочувствительность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Все изоляты вакцинного вируса на основе реассортантного штамма A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) были получены в первый день после вакцинации и сохранили *ts/ca* фенотипические характеристики и полный набор аттенуирующих мутаций, специфичных для донора аттенуации A17. Это подтверждает, что при репродукции вакцинного вируса *in vivo* не происходит реверсии специфических аттенуирующих мутаций в «дикий» тип. Спонтанные мутации, появившиеся гемагглютинине в процессе производства вакцины и ее репликации в ВДП волонтеров, не повлияли на *ts/ca*, а следовательно, аттенуированный фенотип вакцинного штамма. Предположительно, возможна их связь с изменением рецепторных взаимодействий вакцинного вируса клетками РКЭ.

Таблица 7.33 - Репродукция изолятов H5N2 при разных температурах инкубации

Вирус гриппа / изолят	Титр вируса при 33°C, lg ЭИД ₅₀ /мл	Снижение титра вируса (RCT, lg ЭИД ₅₀ /мл) при:		Фенотип
		40°C	26°C	
Контроли				
A17, донор <i>att</i>	9,0	9,0	2,5	<i>ts, ca</i>
H5-ВШ	9,2	9,2	1,5	<i>ts, ca</i>
H5-ЖГВ	10,2	10,2	2,5	<i>ts, ca</i>
НА изолятов идентичен НА вируса NIBRG-23 и вакцинного штамма H5-ВШ				
№ 1	9,2	9,2	2,0	<i>ts, ca</i>
№ 2	9,7	9,7	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 3	8,2	8,2	1,5	<i>ts, ca</i>
№ 4	9,2	9,2	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 5	10,7	10,7	3,0	<i>ts, ca</i>
НА изолятов содержит кодирующие мутации, появившиеся при производстве вакцины H5-ЖГВ или после репликации в ВДП волонтеров				
№ 6	10,7	10,7	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 7	9,2	9,2	2,0	<i>ts, ca</i>
№ 8	8,7	8,7	1,5	<i>ts, ca</i>
№ 9	10,2	10,2	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 10	8,2	8,2	1,5	<i>ts, ca</i>
№ 11	9,2	9,2	3,0	<i>ts, ca</i>
№ 12	10,2	10,2	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 13	10,2	10,2	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 14	9,7	9,7	2,5	<i>ts, ca</i>
№ 15	10,2	10,2	3,0	<i>ts, ca</i>
№ 16	9,2	9,2	2,5	<i>ts, ca</i>

Таким образом, результаты клинического исследования продемонстрировали фенотипическую и генетическую стабильность аттенуированных свойств потенциально пандемической H5-ЖГВ на основе вакцинного штамма A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2).

7.5 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ВИРУСОВ ГРИППА

Как было продемонстрировано в главе 6, фенотипические свойства современных естественно циркулирующих «диких» вирусов существенно различаются. Среди сезонных возбудителей гриппа встречается много температурочувствительных вирусов, иногда распространение получают холодоустойчивые варианты. Случается, что возбудителями сезонной заболеваемости становятся вирусы, обладающие *ts/non-ca*, *non-ts/ca* и даже *ts/ca*

фенотипом. Большая доля вирусов гриппа А (H3N2) и «Ямагата»-подобные вирусы характеризуются чувствительностью к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови, а в последнее время *is* вирусы стали выделяться и среди представителей линии «В/Виктория». Не вдаваясь в рассуждения о степени вирулентности подобных вирусов гриппа, следует констатировать, что если такие вирусы обладают антигенной новизной и приобретают достаточно широкое распространение, то ВОЗ принимает решение о необходимости подготовки на их основе новых вакцин. В подобных ситуациях при получении реассортантов для живой гриппозной вакцины возникают определенные сложности.

7.5.1 ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПАНДЕМИЧЕСКИХ И ОБЛАДАЮЩИХ ПАНДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ ВИРУСОВ ГРИППА

На примере возбудителя пандемии А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm, который характеризуется *non-ts/non-ca/ir* фенотипом, видно, что в условиях, когда работают все селективные факторы, проблем в разработке вакцинного штамма не возникло.

Также успешно был получен реассортант для ЖГВ к *non-ts/non-ca* вирусу гриппа свиней А/Индиана/10/11 (H3N2)v. Этот штамм характеризуется ингибиторочувствительным фенотипом, что в данном случае не повлияло на эффективность формирования 6:2 реассортантов. Как нами было продемонстрировано, с помощью RDE ингибиторы сыворотки, актуальные для этого вируса гриппа свиней, были инактивированы.

Успешное скрещивание новых для человеческой популяции пандемического А (H1N1)pdm2009 и свиного А (H3N2)v вирусов гриппа с донором аттенуации, который получен на основе вируса гриппа человека А (H2N2), является хорошим примером эффективности метода классической реассортации для сероподтипов вирусов гриппа А, которые уже доказывали свою способность вызывать пандемии и циркулируют среди людей. Между скрещиваемыми вирусами наблюдалось полная генетическая совместимость что свидетельствует об универсальности донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для реассортации известными человеческой популяции сероподтипами вирусов.

Однако, при реассортации вирусов гриппа животных других сероподтипов, обладающих пандемическим потенциалом, с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), который является вирусом гриппа человека, могут возникать проблемы. С такой сложностью в реассортации мы столкнулись при разработке штаммов ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А (H5N1). Как описано в разделе 7.4, в скрещивании с донором аттенуации А17 использовались H5N1/PR8-RG реассортантные штаммы, созданные для

инактивированной вакцины. Эти штаммы позволили работать над созданием ЖГВ в РКЭ, они безопасны для людей и куриных эмбрионов за счет удаления фактора патогенности – полиосновного мотива из четырех аминокислот в сайте рестрикции NA. Внутренние белки RG-реассортантов принадлежат донору высокой урожайности A/PR8/34.

Путем замены генов A/PR8/34 на гены A17 методом классической реассортации нами были получены температурочувствительные и холодоадаптированные реассортантные штаммы, которые, как показали доклинические и клинические исследования, могут служить основой для производства живых гриппозных вакцин против пандемически опасных высоковирулентных вирусов птичьего гриппа А (H5N1). Однако все вакцинные штаммы на основе трех вирусов гриппа птиц наследовали от вируса гриппа птиц единственный ген NA (H5), а все остальные гены – от донора аттенуации (7:1 реассортанты). Все попытки получить штамм, содержащий не только гемагглютинин, но и нейраминидазу вируса птичьего происхождения, были безрезультатны.

В случае разработки ЖГВ к вирусу А/индюк/Турция/01/05 (H5N1), единственной возможностью получить даже 7:1 вакцинные реассортанты оказалось поэтапное скрещивание предварительно инактивированного ультрафиолетом штамма NIBRG-23, несущего поверхностные антигены птичьего происхождения, с донором аттенуации. В результате скрещивания были получены «тройные реассортанты» с генами от вирусов H5N1, PR8 и A17. Последующее скрещивание «тройных реассортантов» с донором аттенуации привело к получению штаммов, у которых все внутренние гены вируса PR8 и NA птичьего гриппа были замещены на соответствующие гены донора аттенуации.

Безуспешность получения реассортантов с формулой генома 6:2 может объясняться особенностями констелляции генов вирусов H5N1–PR8. Обнаружилась прочная взаимосвязь между генами PB2/PR8 и NA/N1 птичьего гриппа, которые всегда наследовались реассортантами вместе. В тех случаях, когда в геном реассортантного вируса включался ген PB2 донора аттенуации, NA наследовалась также от донора аттенуации, и наоборот, включение в геном «дикий» NA сопровождалось наследованием гена PB2 от A/PR8, что неприемлемо для ЖГВ (табл. 7.34).

Вакцинные штаммы с формулой генома 7:1 были аттенуированными и высоко иммуногенными для животных (хорьков) и эффективно защищали их от инфекции как гомологичными, так и гетерологичными высоковирулентными вирусами гриппа птиц. Доклиническую характеристику 7:1 кандидатов в ЖГВ вакцин сравнивали с такой характеристикой 6:2 RG-ЖГВ, содержащего NA и NA вируса А/Вьетнам/1203/04 (H5N1). 7:1 и 6:2 реассортанты по безопасности, иммуногенности и протективной активности не отличались.

Таблица 7.34 Принадлежность генов NA и PB2 у реассортантов, полученных при скрещивании донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с вакцинными штаммами для инактивированной гриппозной вакцины

Вирус А(H5N1)-PR8-RG ² с генами внутренних белков от вируса А/PR8	Реассортанты, полученные при скрещивании донора аттенуации А17 (H2N2) с А(H5N1)-PR8-RG реассортантами ¹				
	ВСЕГО	Число (%) реассортантов, унаследовавших указанный ген от того или иного родительского вируса ²			
		PB2 - PR8	PB2 - А17 ³	NA - wt N1	NA - А17 N2
NIBRG-23 ³	17	0	17 (100 %)	0	17 (100 %)
	20	20 (100 %)	0	20 (100 %)	0
INDO-PR	11	0	11 (100 %)	0	11 (100 %)
VN-PR	28	0	28 (100 %)	0	28 (100 %)
	14	14 (100 %)	0	14 (100 %)	0

¹NA реассортантов всегда наследовался от дикого родительского вируса. Принадлежность генов PB1, PA, NP, M и NS варьировала.

²Вакцинный штамм для инактивированной гриппозной вакцины, подготовленный на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А (H5N1) и донора высокой урожайности А/PR/8/34.

³В таблице суммированы результаты, полученные при скрещивании с донором аттенуации нативного и инактивированного ультрафиолетовым облучением вируса.

В исследованиях на добровольцах штамм ЖГВ к вирусу гриппа птиц А/индюк/Турция/01/05 (H5N1) также проявил себя безопасным и иммуногенным, что позволяет считать приемлемым разработанный нами метод получения штаммов ЖГВ к высокопатогенным вирусам на основе реассортации с донорами аттенуации RG вирусов гриппа для инактивированной вакцины.

7.5.2 ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА

Разработка реассортантных штаммов ЖГВ в развивающихся куриных эмбрионах достаточно трудоемкий и длительный процесс, занимающий не менее 2,5-3 месяцев. Для того чтобы штамм ЖГВ успел пройти все требуемые тесты, и ЖГВ была подготовлена производством к новому эпидемическому сезону, требуется максимально ускорить сроки разработки вакцинного реассортанта. Для этого необходимо иметь стратегию реассортации и селекции, зависящую от индивидуальных свойств эпидемического родителя.

Получение 6:2 реассортантов осложнено, когда эпидемический вирус по биологическим характеристикам, которые используются в качестве селективных факторов, не соответствует «классическим диким» вирусам. Используемые селективные факторы – пониженная

температура инкубации и сыворотка к донору аттенуации – способствуют отбору клонов с генами NA и NA от эпидемического родителя, и с генами полимеразного комплекса от *ts/ca* донора аттенуации. Ген NP, хоть и не имеет специфических аттенуирующих мутаций у обоих доноров аттенуации A17 и B60, чаще всего переходит в состав реассортанта от донора вместе с другими генами полимеразного комплекса. Достаточно часто от «дикого» родителя в состав реассортантов переходят гены M и NS, поскольку не содержат *ts/ca* мутаций и селективные факторы их не дифференцируют. Согласно приказу № 156/29 МЗ РФ [115], допускается использование 5:3 реассортантов, если дополнительный ген от «дикого» вируса не содержит *ts/ca* мутаций, поэтому реассортанты ЖГВ с «диким» геном M или NS допустимы. Однако, чаще всего среди вирусного потомства 5:3 клоны присутствуют наряду с 6:2. Имеется интересное наблюдение: при клонировании методом предельных разведений, выделенный из самого последнего разведения клон, чаще всего имеет формулу генома 5:3, наследуя лишний ген M или NS от «дикого» родителя. При этом из предыдущего разведения удается выделить клоны с вакцинной формулой генома 6:2.

Далее рассмотрены методические приемы, которые могут быть использованы для успешной реассортации доноров аттенуации с различающимися по биологическим свойствам эпидемическими вирусами.

7.5.2.1 Подготовка реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе холодоустойчивых вирусов гриппа. При подготовке штаммов ЖГВ на основе природно-холодоустойчивых вирусов гриппа нивелируется значение такого мощного селективного фактора, как пониженная температура инкубации. Однако, холодоустойчивость «диких» вирусов обычно бывает ниже, чем у доноров аттенуации (табл. 7.2-7.4), и пониженная температура, как селективный фактор, будет работать. Если же «дикий» родитель высоко холодоустойчив, нет необходимости проводить селективные пассажи реассортантов при пониженной температуре. В этом случае пассирование при оптимальной температуре с единственным селективным фактором – сыворотка против донора аттенуации, по крайней мере сократит продолжительность селективных пассажей, освободив дополнительное время на анализ состава генома реассортантов. Успеху отбора 6:2 штаммов ЖГВ из обширного количества реассортантов, различающихся по композиции генов, кодирующих внутренние белки, будут способствовать модифицированные нами экспресс методы скрининга реассортантов «да-нет» мультиплекс ПЦР и RFLP.

7.5.2.2 Подготовка реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе температурочувствительных эпидемических вирусов гриппа. У температурочувствительных

эпидемических вирусов гриппа диапазон перmissive для репродукции температуры сужается. Непосредственного влияния температурочувствительности «дикого» родителя на успех реассортации как будто быть не должно, однако на практике 6:2 реассортанты на основе температурочувствительных вирусов гриппа получить существенно сложнее. Кроме того, утрачивается маркер, при котором температурочувствительность реассортанта свидетельствует о наследовании генов полимеразного комплекса от донора аттенуации, что не дает возможности проводить первичный отбор клонов по фенотипическим признакам.

При подготовке штаммов ЖГВ можно провести поиск более температуроустойчивого вируса среди антигенных аналогов. При общей тенденции к снижению порога температуроустойчивости современных эпидемических вирусов гриппа А и В, в ряде случаев удается выделить штаммы, способные к репродукции при температурах выше оптимальных. Например, в таблице 7.3 представлены антигенные аналоги – *non-ts* вирус А/Виктория/361/11 (H3N2) и *ts* при 40°C вирус А/Техас/50/12. Также в главе 6 продемонстрировано, что среди циркулирующих температурочувствительных антигенно идентичных вирусов могут встречаться более температуроустойчивые варианты. Поэтому для оптимизации отбора кандидатов в вакцинные штаммы в качестве эпидемических родительских вирусов, в ряде случаев существует возможность подбирать штаммы антигенно идентичные предложенным ВОЗ, но обладающие большей устойчивостью репродукции при температурах выше оптимальных. При отсутствии возможности подобрать *non-ts* эквивалент актуальному эпидемическому штамму, возможен вариант выделения его температуроустойчивого клона.

В таблице 7.35 представлены результаты попытки выделить температуроустойчивые клоны из популяции двух вирусов гриппа В/Техас/26/08 и В/Джилин/20/03.

Исходный температурочувствительный вирус В/Джилин/20/03 (ветвь «Ямагата») накоплен в РКЭ 10⁻³ разведением. Из 9 выделенных клонов 1 клон (клон 3) обладал *non-ts* фенотипом при 37°C, RCT₃₇=3,0. Этот клон был использован для получения вакцинного реассортанта.

Исходный температурочувствительный вирус В/Техас/26/08 (ветвь «Виктория») был накоплен 10⁻² разведением. Из 8 выделенных клонов ни одного, обладающего *non-ts* фенотипом при 37°C выделить не удалось.

При волнообразной эволюции признака температурочувствительности гетерогенность популяции эпидемического вируса гриппа, по-видимому, может наблюдаться в период циркуляции вирусов гриппа, различающихся по температурочувствительности. Когда же При волнообразной эволюции признака температурочувствительности гетерогенность популяции эпидемического вируса гриппа, по-видимому, может наблюдаться в период циркуляции вирусов гриппа, различающихся по температурочувствительности. Когда же

Таблица 7.35 - Характеристика репродуктивной активности клонов из популяции эпидемических вирусов гриппа В в РКЭ

Вирус/клон	репродуктивная активность при t°C				фенотип
	32°	25°	37°	38°	
В/Джилин/20/03 («Ямагата»)	6,2	≤1,2	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
1 клон	7,2	≤1,2	1,7	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
2 клон	6,2	≤1,2	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
3 клон	8,2	2,2	5,2	≤1,2	<i>non-ts/non-ca</i>
4 клон	7,7	1,7	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
5 клон	7,7	2,2	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
6 клон	8,2	2,2	1,7	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
7 клон	7,7	1,7	1,7	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
8 клон	6,7	≤1,2	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
9 клон	6,2	≤1,2	2,2	≤1,2	<i>ts/non-ca</i>
В/Техас/26/08 («Виктория»)	8,2	2,2	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
1 клон	6,7	1,7	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
2 клон	7,2	2,2	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
3 клон	7,7	1,7	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
4 клон	8,2	2,2	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
5 клон	7,7	1,7	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
6 клон	8,2	3,2	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
7 клон	8,7	2,7	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>
8 клон	7,2	1,7	≤1,2	<1,2	<i>ts/non-ca</i>

выделяются однородные по признаку температурочувствительности вирусы, как в период циркуляции В/Техас/26/08, популяция штамма также более однородна. Пример выделения *non-ts* клонов из популяции двух вирусов гриппа В демонстрирует, что не всегда удастся изолировать отличающийся по температурочувствительности клон, однако при успешном выделении *non-ts* клона в скрещивание следует взять именно его.

Проблема выбора родительского вируса по принципу его температуроустойчивости имеет и другой аспект. Проведенный нами ретроспективный анализ реассортантных вакцинных штаммов вируса гриппа, полученных в разные годы, показал, что они могут обладать разным уровнем иммуногенной активности [47]. При этом прослежена возможная связь между уровнем температуроустойчивости эпидемических вирусов и иммуногенностью для людей подготовленных на их основе реассортантных вакцинных штаммов.

7.5.2.3 Подготовка реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе эпидемических вирусов гриппа чувствительных к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови. В последнее время многие штаммы, рекомендуемые ВОЗ в качестве основы для подготовки гриппозных вакцин на будущий сезон, были высокочувствительны (*is*) к термостабильным неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади.

Таковы, в частности, целый ряд современных вирусов гриппа А (H3N2) и вирусы гриппа В линии «Ямагата».

Стандартный протокол подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ включает обработку антисыворотки к донору аттенуации с помощью фермента RDE для удаления неспецифических ингибиторов. Однако в обработанной RDE сыворотке могут сохраняться термостабильные ингибиторы [187, 326], что искажает значения титра сыворотки и может осложнять получение вакцинных реассортантов на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов.

При разработке современных штаммов ЖГВ на основе вирусов гриппа А и В часто приходится сталкиваться с ситуацией, когда в геном реассортанта включается нейраминидаза донора аттенуации. В настоящем разделе работы мы проанализировали эффективность реассортации доноров аттенуации с эпидемическими вирусами отличающимися по чувствительности к неспецифическим сывороточным ингибиторам.

Проведенный нами анализ эффективности совместного перехода NA и NA в геном 684 реассортантов, подготовленных на основе 35 «диких» вирусов показал, что определенная часть «диких» вирусов легко вступала в реассортацию, позволяя эффективно получать вакцинные штаммы с формулой генома 6:2. Однако, реассортанты, подготовленные на основе других вирусов, в подавляющем большинстве наследовали антигенно неактуальную NA от донора аттенуации (табл. 7.36). При этом процентное соотношение вакцинных 6:2 реассортантов среди устойчивых к термостабильным сывороточным ингибиторам вирусов А (H1N1) и В линии «Виктория» было существенно выше по сравнению с вирусами А (H3N2) и В линии «Ямагата». Все вирусы линии «Ямагата» и большое число вирусов сероподтипа А (H3N2) характеризуются ингибиторочувствительностью.

Вне зависимости от принадлежности «дикого» родителя к роду А или В, NA ингибитороустойчивых вирусов встраивалась в геном реассортантов достоверно чаще, чем NA ингибиторочувствительных вирусов (табл. 7.36). Так, анализ состава генома реассортантов на основе *is* вирусов, показал, что только 19,5% от общего числа клонов (78 из 401) унаследовали нейраминидазу «дикого» типа. Тогда как среди реассортантов на основе *ir* вирусов, NA «дикого» родителя включали 92,2 % (261 из 283). Хотя, иногда наблюдались исключения: так, реассортанты *is* вируса А/Нанчанг/933/95 (H3N2) наследовали нейраминидазу исключительно от «дикого» родителя.

Таким образом, нами обнаружена тенденция избирательного перехода в состав генома реассортантных штаммов вирусов гриппа NA от «дикого» или аттенуированного родителя в зависимости от устойчивого или чувствительного к ингибиторам фенотипа «дикого» вируса.

Таблица 7.36 - Влияние ингибиторочувствительности эпидемических вирусов гриппа на включение их нейраминидазы в состав реассортантов при скрещивании с донорами аттенуации

«Дикий» родительский вирус	Чувствительность к ингибиторам	Реассортанты			
		ВСЕГО	wt NA	ca NA	
<i>Вирусы гриппа В</i>					
В/Шангдонг/7/97	«Виктория»	Устойчивый	8	8	0
В/Гонконг/330/01		Устойчивый	6	6	0
В/Малайзия/2506/04		Устойчивый	29	27	2
В/Огайо/01/05		Устойчивый	17	17	0
В/Техас/26/08		Устойчивый	12	5	7
В/Брисбен/60/08		Устойчивый	16	14	2
В/Техас/02/13		Устойчивый	8	6	2
В/Харбин/07/94	«Ямагата»	Чувствительный	4	3	1
В/С.-Петербург/92/95		Чувствительный	8	3	5
В/Иоганнесбург/05/99		Чувствительный	14	5	9
В/Шанхай/361/02		Чувствительный	18	6	12
В/Джилина/20/03		Чувствительный	10	4	6
В/Флорида/7/04		Чувствительный	14	5	9
В/Флорида/4/06		Чувствительный	31	3	28
В/Брисбен/3/07		Чувствительный	13	1	12
В/Висконсин/1/10		Чувствительный	140	4	136
В/Техас/6/11		Чувствительный	12	7	5
<i>Вирусы гриппа А (H3N2)</i>					
А/Иоганнесбург/33/94	Устойчивый	9	9	0	
А/Вайоминг/3/03	Устойчивый	4	4	0	
А/Калифорния/07/04	Устойчивый	27	26	1	
А/Висконсин/67/05	Устойчивый	19	17	2	
А/Виктория/361/11	Устойчивый	16	16	0	
А/Нанчанг/933/95	Чувствительный	20	20	0	
А/Сидней/5/97	Чувствительный	58	2	56	
А/Панама/2007/99	Чувствительный	7	1	6	
А/Малайзия/01/04	Чувствительный	8	2	6	
А/Веллингтон/01/04	Чувствительный	30	9	21	
А/Брисбен/10/07	Чувствительный	14	3	11	
<i>Вирусы гриппа А (H1N1)</i>					
А/Пекин/262/95	Устойчивый	18	15	3	
А/Перт/13/95	Устойчивый	7	7	0	
А/Иоганнесбург/82/96	Устойчивый	6	6	0	
А/Н.Каледония/20/99	Устойчивый	50	50	0	
А/Соломоновы о-ва/06	Устойчивый	8	8	0	
А/Гонконг/2652/06	Устойчивый	10	9	1	
А/Брисбен/59/07	Устойчивый	13	11	2	
ВСЕГО ВИРУСОВ	ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ	16 (401 кл)	19,5% (78 кл)	80,5% (323кл)	
	УСТОЙЧИВЫХ	19 (283 кл)	92,2% (261кл)	7,8% (22 кл)	
Всего вирусов А(H1N1)	УСТОЙЧИВЫХ	112кл	94,6% (106 кл)	5,4% (6 кл)	
Всего вирусов А(H3N2)	ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ	137 кл	27,0% (37кл)	73,0% (100кл)	
	УСТОЙЧИВЫХ	75 кл	95,7% (72кл)	4,3% (3 кл)	
Всего вирусов «В/Ямагата»	ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ	264 кл	15,5% (41 кл)	84,5% (223 кл)	
Всего вирусов«В/Виктория»	УСТОЙЧИВЫХ	96 кл	86,5% (83кл)	13,5% (13 кл)	

¹Все реассортанты унаследовали гемагглютинин от «дикого» родительского вируса. замена Glu-436-Lys.

Мы также обнаружили, что при переходе в 7:1 реассортант HA от «дикого» вируса, а NA от донора аттенуации, в ряде случаев в гене NA появляются мутации (табл. 7.37). Причем эти мутации являются общими для нейраминидаз донора A17 или B60/525 в составе реассортантов на основе разных «диких» вирусов.

Таблица 7.37 - Отличия последовательностей гемагглютинина и нейраминидазы у одногенных (7:1) реассортантов вирусов гриппа

Родительский вирус		Реассортант, принадлежность гена		Замены в HA и NA реассортанта в сравнении с родительским вирусом			
				нуклеотидные замены		аминокислотные замены	
WT вирус или A/H5N1/PR8-RG реассортант	Донор <i>att</i>	HA	NA	HA	NA	HA1	NA
NIBRG-23 (H5N1)	A17 ¹	WT	A17	нет	G-765-T	нет	Arg-249-Ile
INDO/05 (H5N1)	A17	WT	A17	нет	нет	нет	нет
INDO/05 (H5N1)	A17	WT	A17	нет	нет	нет	нет
VN1203 (H5N1)	A17	WT	A17	нет	нет	нет	нет
VN1203 (H5N1)	A17	WT	A17	T-50-C T-417-C	G-765-T нет	нет Ile-114-Thr	Arg-249-Ile нет
В/Харбин/07/94	B60 ²	WT	B60	нет	G-1085-A	нет	нет
В/Техас/26/08	B60	WT	B60	нет	нет	нет	нет
В/Висконсин/1/10	B60	WT	B60	нет	G-1359-A	нет	Glu-436-Lys
В/Бангладеш/1994/10	B60	WT	B60	нет	G-1085-A	нет	нет
В/Техас/06/11	B60	WT	B60	нет	G-1359-A	нет	Glu-436-Lys

Так, у 7:1 реассортантов с HA H5 от вирусов NIBRG-23 и VN1203 (H5N1), в гене NA, происходящем от донора аттенуации A17, возникла одинаковая мутация G-765-T, приведшая к аминокислотной замене Arg-249-Ile. У 7:1 реассортантов с HA от «диких» вирусов В/Харбин/07/94 и В/Бангладеш/1994/10 в гене NA от донора B60/525 появилась одинаковая молчащая мутация G-1085-A. Следствием мутации G-1359-A в гене NA от донора *att* B60/525 реассортантов с HA от вирусов В/Висконсин/1/10 и В/Техас/06/11 стала аминокислотная замена Glu-436-Lys.

Эти мутации не изменяют антигенные свойства реассортанта, не влияют на чувствительность к ингибиторам нейраминидаз (что было проверено на 7:1 реассортантах сероподтипа H5N2). Идентичность мутаций у разных вирусов одного сероподтипа HA H5 и разных вирусов гриппа В наводит на мысль об их едином функциональном значении. Возможно, эти мутации являются результатом подстройки NA к «чужому» HA для обеспечения их функционального баланса. Не исключена также возможность минорной гетерогенности

доноров аттенуации по выявленным позициям, которую не удалось обнаружить при секвенировании гена.

Оценка эпидемических вирусов по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам позволяет подобрать наиболее рациональные мероприятия для успешного получения вакцинных реассортантов на основе актуального *is* вируса. Такими мероприятиями должны быть: подбор оптимального соотношения родительских вирусов, взятых в скрещивание (превалирование *is* родителя над донором аттенуации), подбор оптимальной рабочей концентрации антисыворотки к донору, которая не должна превышать установленную опытным путем величину 50 ГАЕ. В этой ситуации особенно важно использование максимально высокотитражной сыворотки, что позволяет снизить концентрацию неспецифических ингибиторов в рабочем разведении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Приведенные примеры анализа особенностей эпидемического штамма, как компонента скрещивания при получении ЖГВ, дает возможности для выбора подходящей стратегии реассортации и отбора клонов.

ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании способность вирусов гриппа к изменчивости свойств рассматривается с двух позиций. С точки зрения эволюционной изменчивости, которая является фундаментальной характеристикой вирусов гриппа. Это свойство накладывает существенный отпечаток на эффективность методов борьбы с гриппозной инфекцией, вынуждая постоянно разрабатывать новые противовирусные препараты. Вторая сторона исследования – реализация возможностей использования способности вирусов к изменчивости свойств с целью направить ее во благо – для эффективной разработки живых гриппозных аттенуированных вакцин.

Руководствуясь поставленной задачей, из многообразия свойств эволюционирующих вирусов гриппа выбраны те, которые в настоящее время рассматриваются как существенно влияющие на процесс подготовки штаммов ЖГВ и, отчасти, на качество вакцинного препарата, такие как температурный диапазон репродукции вирусов гриппа – *ts/ca* фенотип, чувствительность к неспецифическим сывороточным ингибиторам.

Продуктом индуцированной изменчивости «диких» вирусов стала разработка в лабораторных условиях температурочувствительных, холодоадаптированных доноров аттенуации на основе вирусов гриппа А и В для ЖГВ и сами вакцинные штаммы, получаемые в результате реассортации доноров аттенуации и актуальных эпидемических вирусов гриппа.

Отечественная живая гриппозная аттенуированная реассортантная вакцина, разработана в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ». Вакцинные реассортанты имеют композицию генома 6:2, это означает, что штамм ЖГВ наследует от эпидемического родителя два основных антигена вируса вместе с его гемагглютинином и нейраминидазой, а аттенуированные свойства приобретает с шестью внутренними белками (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) вируса-донора аттенуирующих свойств.

За время использования ЖГВ многократно доказала свою безвредность, иммуногенность, высокие защитные свойства для всех возрастных групп населения и способность к формированию коллективного иммунитета (Глава 3). Однако для успеха разработки реассортантных штаммов ЖГВ необходимо понимание молекулярно-генетических основ аттенуации доноров и роли мутантных генов донора в составе реассортантов с эпидемическими вирусами. Проведены многочисленные исследования, но остался ряд вопросов, требующих решения.

В качестве доноров аттенуации для отечественной реассортантной холодоадаптированной ЖГВ применяются холодоадаптированные (*ca*), температурочувствительные (*ts*) антигенно

неактуальные вирусы гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (A17) и В/СССР/60/69 (В60). Они характеризуются ареактогенностью и безвредностью для взрослых и для детей [5].

Доноры аттенуации получены экспериментально из эпидемических вирусов в результате их серийного пассирования в развивающихся куриных эмбрионах. Длительное последовательное пассирование вирусов А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 сначала при оптимальной 32-33°C, а затем при пониженной до 25-28°C температуре способствовало полному устранению вирулентных свойств исходных эпидемических вирусов [5, 6].

Установление молекулярных основ *ts*, *ca* и *att* фенотипа доноров осложнено тем, что у каждой пары: «дикий» - аттенуированный вирус А/Ленинград или В/СССР утрачено одно из звеньев процесса переадаптации на пути к аттенуации.

Так, для донора А17 известен его «дикий» предшественник А/Ленинград/134/57 (H2N2), обладающий *non-ts/non-ca* фенотипом, характерным для пандемических вирусов гриппа, и конечный вариант – *ts/ca* донор аттенуации, который прошел 25 пассажей при оптимальной температуре 32-33°C, и 17 пассажей при пониженной температуре. Промежуточные пассажные варианты, подобные *ts/non-ca*, помогли бы детализировать роль каждой мутации. Однако эта задача сейчас реализована с помощью приемов обратной генетики [289].

В большей степени осложнена ситуация с донором В60 – утрачен его «дикий» предшественник, который должен обладать *non-ts/non-ca* характеристиками, как и другие эпидемические вирусы того же временного периода. Вирус В/СССР/69, который предположительно рассматривался в качестве предшественника донора В60, никак не может им быть из-за обилия различий между ними в нуклеотидных последовательностях всех генов. Имеется, однако, важный промежуточный вариант, который в результате 17 пассажей при оптимальной температуре стал температурочувствительным, но еще не приобрел *ca* фенотип, и из которого в результате 60 пассажей при пониженной температуре 25-26°C был создан донор аттенуации В/СССР/60/69 [6, 135].

К настоящему времени чистая линия донора аттенуации А17 (H2N2) всесторонне охарактеризована. Установлено, что мутации в генах полимеразного комплекса играют определяющую роль в аттенуации *ca* донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). К формированию *ts* фенотипа, независимо друг от друга, приводили мутация в белке PB2 и 2 мутации в белке PB1. Воссоздание донора А17 методами RG с помощью плазмидной технологии и замена специфичных для донора мутаций на последовательности, характерные для исходного «дикого» вируса, позволили подтвердить и конкретизировать роль каждой мутации в проявлении *ts* фенотипа [289]. Не было выявлено видимого влияния на аттенуацию холодоадаптированного вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) приобретенных донором мутаций в генах, кодирующих

М и NS1 белки, но показано, что минорный вклад в температурочувствительность привносит белок NS2.

Исследования отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), как и доноров для американской ЖГВ FluMist[®], созданных на основе вирусов А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) и В/Энн Арбор/1/66, показали наличие взаимосвязи между аттенуацией для хорьков и *ts* фенотипом, но не между аттенуацией и *ca* фенотипом [296, 322].

Приведенные результаты характеризуют свойства самого донора аттенуации. Окончательно не выясненным оставался важный аспект: каково влияние мутантных генов донора аттенуации А17, находящихся в окружении генов не своего дикого предшественника А/Ленинград/134/57 (H2N2), а современных генетически удаленных от него эпидемически актуальных вирусов. Именно создание таких реассортантов является целью при разработке штаммов ЖГВ. В настоящей работе представлены результаты такого исследования.

На основе приведенного в настоящей работе изучения *ts* фенотипа набора одно- и полигенных реассортантов между донором аттенуации А17 и штаммом А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) и реассортантов донора с современными температуроустойчивыми эпидемическими вирусами гриппа А(H1N1) и А(H3N2) показано обязательное, однако недостаточное участие белка PB2 донора в проявлении признака температурочувствительности. Продемонстрировано, что проявление температурочувствительного фенотипа реассортантов донора А17 с филогенетически удаленными вирусами гриппа А обеспечивается констелляцией белков полимеразного комплекса как PB2+PB1, так и PB2+PA от донора аттенуации. И наоборот, замена в геноме реассортанта мутантного гена PB2 донора на ген «дикого» вируса приводит к потере его температурочувствительности, а включение в геном реассортанта «диких» генов PA, NP, М и NS по отдельности или в разных комбинациях не влияет на *ts* фенотип. Также не приводит к изменению фенотипа включение в состав температурочувствительного реассортанта гена PB1 от «дикого» вируса при сохранении комплекса PB2 + PA от донора. Комплекс же «диких» полимеразных генов PB1 + PA не является определяющим, и без участия гена PB2 не приводит к манифестации признака температуроустойчивости. Таким образом, изучение реассортантов между донором А17 и разными неродственными ему вирусами выявило участие в наследовании температурочувствительности, наряду с генами PB2 и PB1, также гена PA, причем для проявления *ts* фенотипа таких реассортантов обязательна констелляция гена PB1 или PA с геном PB2.

Важно отметить, что все кодирующие мутации в генах внутренних белков, в том числе белков полимеразного комплекса, *ts/ca* доноров аттенуации А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) для американской и А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для отечественной ЖГВ, расположены в

несовпадающих по локализации сайтах (Глава 3). Не выявлено также совпадений в локализации мутаций с геномами экспериментальных холодоадаптированных потенциальных доноров аттенуации сероподтипа (H2N2): А/Москва/21/17/65, А/Краснодар/101/35/59/ и подготовленного в культуре клеток Vero А/Сингапур/1/57са, (табл. 3.2). Эти данные свидетельствуют о том, что наличие в геноме каких-либо фиксированных, ответственных за аттенуацию позиций, не обязательно, мишенью для таких мутаций у разных вирусов являются те или иные гены полимеразного комплекса. Важно, что в процессе холодной адаптации различных вирусов гриппа А в их геноме появляются *ts/ca* мутации, и вместе с температурочувствительностью штаммы приобретают аттенуированный фенотип.

Донор аттенуации В60 не был охарактеризован так полно на молекулярном уровне. До настоящего исследования не была дана характеристика гетерогенности популяции донора В60, донор не был клонирован, не были описаны аттенуирующие мутации, появившиеся в результате пассирования его «дикого» предшественника при оптимальной и пониженной температуре инкубации. Не была изучена роль его отдельных мутантных генов в аттенуации. Как упоминалось выше, осложнения в исследованиях связаны с тем, что, «дикий» предшественник донора В60 неизвестен.

В настоящей работе представлена генетическая и фенотипическая характеристика донора аттенуации В60. Прежде всего, продемонстрировано, что исходная популяция донора В60 гетерогенна и состоит из *ts/ca* вариантов, которые по высокой температурочувствительности при 38°C между собой фенотипически не различаются, но при снижении температуры инкубации до 37°C образуют две группы: *ts37°* и *non-ts37°*. Представители этих двух групп – *non-ts37°* (В60/525) и *ts37°* (В60/252) различаются между собой лишь по одной аминокислотной замене Пе-644-Val в белке РВ1, которая была выявлена у более температурочувствительного клона В60/252. С высокой степенью вероятности можно полагать, что формирование более выраженной температурочувствительности, проявляющейся уже при 37°C у клона В60/252, связано с обнаруженной мутацией.

Сравнение иммуногенных характеристик, отличающихся по температурочувствительности клонов на морских свинках, показало более высокий гуморальный ответ при интраназальном введении животным клона В60/525 *non-ts37°*, что коррелировало с его лучшей репродуктивностью в носовых ходах.

Очевидно, дополнительная мутация в гене РВ1 привела к гиператтенуации клона В60/252 *ts37°*.

Представленные результаты не только свидетельствуют о гетерогенности популяции донора В/СССР/60/69, но и о том, что использование неклонированного донора может привести к получению вакцинных штаммов со сниженной иммуногенностью. По генетическим,

биологическим характеристикам, по результатам изучения приживляемости и иммуногенности у лабораторных животных предпочтение было отдано клону В60/525, который с 2001 года используется в качестве донора аттенуации при подготовке вакцинных реассортантов для отечественной ЖГВ.

Для установления роли генов, кодирующих внутренние белки, в проявлении фенотипических особенностей донора аттенуации В60 были получены и проанализированы реассортанты с различным набором генов между эпидемическими *non-ts* вирусами гриппа В с *ts* донором аттенуации В60. Анализ температурочувствительности реассортантов свидетельствует, что полимеразные гены PB2 и PA донора В60 в составе генома реассортантов на основе эпидемических вирусов, как совместно, так и по отдельности, определяют формирование *ts* фенотипа.

Только гены, кодирующие белки полимеразного комплекса, ответственны за проявление *ts* фенотипа, как отечественного донора аттенуации В/СССР/60/69 (PA и PB2), так и донора для американской ЖГВ FluMist® В/Энн Арбор/1/66са (PA и NP) [278], что указывает на единый механизм формирования температурочувствительности у вирусов гриппа А и В, как у представителей одного рода (А или В), так и между ними (табл.8.1).

Формирование температурочувствительности донора аттенуации В60 проходило в результате длительного культивирования его предшественника при пониженной температуре, что сформировало его холодоустойчивость.

Нами были определены мутации ответственные за становление *sa* фенотипа. На основании изучения реассортантов с разным набором генов от донора В60 и эпидемических *non-sa* вирусов выявлено, что для проявления *sa* фенотипа достаточно присутствия в их составе гена PA. Отсутствие «дикого» вируса-предшественника осложняет идентификацию уникальных аминокислотных замен в геноме донора аттенуации В/СССР/60/69/525, который является лабораторным *ts/sa* мутантом. Поэтому установление специфичных для донора В60/525 мутаций потребовало сравнительного анализа аминокислотных последовательностей донора с последовательностями большого количества эпидемических вирусов гриппа В. Исходя из того факта, что «дикие» вирусы гриппа В 1960–1970 годов выделения, хорошо размножались при повышенной температуре инкубации, можно полагать, что и «дикий» предшественник донора В60 характеризовался *non-ts* фенотипом.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей внутренних белков донора аттенуации В60/525 и «диких» вирусов гриппа В 1940 - 2006 годов циркуляции выявил восемь кодирующих мутаций, специфичных для *ts/sa* донора В60: в белках PB2 -3, в PA - 2, в M1, VM2 и NS1 – по одной. Две из восьми мутаций (одна в белке PB2, а другая – в VM2) не являются уникальными, однако они не были обнаружены у вирусов того временного периода. А

появление подобных мутаций у циркулировавших в последующие годы «диких» вирусов может быть ассоциировано с фактами их природной температурочувствительности. Гены, кодирующие РНП комплекс, содержат четыре уникальных и одну неуникальную мутацию. Сопоставление результатов анализа аминокислотных последовательностей с изучением роли генов позволяет сделать заключение, что уникальные мутации в гене PB2 связаны с температурочувствительностью донора. Мутации в гене PA определяют *ts* и *ca* свойства донора. При сравнении *ts/non-ca* вируса В/СССР/69/17 с *ts/ca* донором В60/525, определены еще 2 мутации – в генах PB2 и PA донора, которые, вероятно, обуславливают *ca* (PA) и вносят вклад в *ts* (PB2) фенотип донора. Гены PB1 и NP клонированного донора В60/525 не содержат мутаций, а фенотипический анализ реассортантов, подтверждает, что эти гены не участвуют в формировании *ts* и *ca* характеристик донора аттенуации. Все аминокислотные замены в белках

Таблица 8.1 - Роль аминокислотных замен в белках доноров аттенуации для российской и американской ЖГВ в проявлении *ts* фенотипа

Ген	Донор <i>att</i> для российской ЖГВ (Ultravac®)		Донор <i>att</i> для американской ЖГВ (FluMist®)	
	число аминокислотных замен	<i>ts</i> фенотип <i>in ovo</i>	число аминокислотных замен	<i>ts</i> фенотип <i>in ovo</i>
	А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [289,319]		А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) [296]	
PB2	1	<i>ts</i>	1	<i>ts</i>
PB1	2	<i>ts</i>	4	<i>ts</i>
PA	2	<i>non-ts</i>	2	<i>non-ts</i>
NP	нет	<i>non-ts</i>	1	<i>ts</i>
M	M1	<i>non-ts</i>	нет	<i>non-ts</i>
	M2		1	
NS	NS1	<i>non-ts</i>	1	<i>non-ts</i>
	NS2	вклад в <i>ts</i>	нет	
РНП-комплекс	5		8	
Ген	В/СССР/60/69		В/Энн Арбор/1/66 MDV [278]	
PB2	2	<i>ts</i>	1 ^{1,2}	–
	1 ¹			
PB1	нет	<i>non-ts</i>	нет	<i>non-ts</i>
PA	2	<i>ts</i>	2	<i>ts</i>
NP	нет	<i>non-ts</i>	4	<i>ts</i>
M	M1	<i>non-ts</i>	2	возможно <i>ts</i>
	BM2		1 ¹	
NS	NS1	<i>non-ts</i>	нет	<i>non-ts</i>
	NS2		нет	
РНП-комплекс	4 + 1 ¹		6 + 1 ¹	

¹Неуникальная мутация. ²Мутантный ген не играет роли в проявлении *ts/att* фенотипа.

полимеразного комплекса сопровождаются сменой заряда или гидрофобности, что подтверждает влияние аминокислотных замен на свойства белков.

Мутации в генах M1, BM2 и NS1 не играют видимой роли в манифестации *ts* признака. Пока их роль остается не выясненной. Физические характеристики белков при выявленных заменах не должны измениться, поскольку они не привели ни к смене гидрофильности, ни к смене заряда. Подобные мутации могут быть обусловлены результатом эпистатического взаимодействия генов, когда мутационное повреждение в определенном локусе фрагмента вирусной РНК может повлечь за собой компенсаторные мутации в других локусах. То есть мутация, обусловленная селективным давлением, приводит к запуску дополнительных мутаций, направленных на то, чтобы изменение имело смысл, проявилось себя, и, чтобы функция гена при этом не была нарушена [247].

Получены доказательства [275], что гены полимеразного комплекса вируса гриппа В мутируют как единый комплекс, чего можно было бы ожидать, учитывая взаимодополняющие функции полимеразных белков. Но были обнаружены сходные филогенетические профили между генами PB2 и PB1, а также между генами PA, NP и M, что дает основание предполагать функциональные взаимодействия между этими генами. Дополнительные мутации в геноме доноров аттенуации, не связанные с приобретением вирусами *ts* и *ca* фенотипа, могут быть следствием подобных взаимодействий генов. Этот вывод согласуется с исследованиями донора В/Энн Арбор/1/66са методами обратной генетики, которые показывают вовлеченность в аттенуацию белка M1. Оказалось, что для проявления аттенуации В/Энн Арбор/1/66са требуется конstellация мутантных генов полимеразного комплекса PA+NP и гена M. Механизм явления заключен в нарушении процесса многоциклового репликации мутантного гена M и, как результат, в снижении включения мутантного белка M1 в вирион [292]. Комбинация мутаций (*ts* (PA+NP) + *att* M) выражается в угнетении при неразрешающих температурах, как полимеразной функции, так и вирусной сборки. Комплексная реализация этих механизмов обеспечивает генетическую стабильность донора аттенуации [184]. Хотя мутации в гене M присутствуют у всех описываемых доноров А и В, их вклад в аттенуацию пока изучен только для донора В/Энн Арбор/1/66.

В литературе имеются также данные об аттенуации другого экспериментального *ts/ca* донора на основе вируса В/Вена/1/99, полученного в культуре клеток Vero [302]. Авторы отмечают, что его *ts* фенотип и аттенуация связаны с мутациями в генах NP, M (BM2) и NS (NS1).

Как уже упоминалось, мутация в белке NS2 привносит дополнительный вклад в аттенуацию донора A17 [289].

Все накопленные факты свидетельствуют о том, что аттенуация имеет полигенный характер, и при доминирующей роли и несомненном значении в аттенуации мутаций в полимеразных генах, приводящих к температурочувствительности, вклад каждого гена может быть важен.

Из приведенных результатов следует вывод о необходимости сохранности у вакцинных реассортантов всех специфичных мутаций в генах, кодирующих внутренние белки донора. Не все аттенуирующие мутации доноров непосредственно связаны с приобретением температурочувствительности, часть из них обусловлена другими функциональными особенностями, однако их присутствие в вирионе создает температурочувствительным донорам стабильность в проявлении суммарного аттенуирующего фенотипа.

Таким образом, полученные на сегодняшний день результаты свидетельствуют, что для обоих вирусов гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69/525, являющихся холодаадаптированными донорами для отечественной ЖГВ, определяющими аттенуацию являются мутации в генах белков полимеразного комплекса (PB2, PB1 и PA). При этом у донора А17 ген PB2 ответственен за *ts/att* и *ca* фенотип, PB1 - за *ts/att* фенотип, PA – за *ca* фенотип. У донора В60/525 ведущую роль в *ts/att* играют гены PB2 и PA, за *ca* фенотип ответственен ген PA.

Установление роли отдельных мутантных генов вакцинного штамма в аттенуации открывает новые пути в разработке живых гриппозных вакцин следующего поколения. В частности, позволяет подобрать наилучшее для усиления иммунного ответа сочетание мутантных и немутантных генов в составе генома вакцинного штамма, а также использовать гены, ответственные за определенный фенотип, в качестве векторов при подготовке генно-инженерных вакцин негриппозной природы.

Успех получения вакцинных препаратов напрямую зависит от свойств родительских вирусов, вступающих в реассортацию. Донор аттенуации – постоянный и стабильный компонент скрещивания. Ежегодно обновляемым компонентом является изменчивый эпидемический вирус. Фенотипические особенности эпидемического родителя зачастую являются дестабилизирующим фактором при получении штаммов ЖГВ.

В процессе получения вакцинных штаммов предусматриваются условия, обеспечивающие селекцию реассортантов с заданными характеристиками. Такими селективными факторами являются пониженная температура инкубации РКЭ, инфицированных реассортантами, и их культивирование в присутствии гипериммунной сыворотки против донора аттенуации. Температура 25-26°C создает условия приоритетной репликации генов, кодирующих внутренние белки холодоустойчивого донора, а добавление к продуктам скрещивания при

селективных пассажах гипериммунной сыворотки против донора способствует формированию реассортантов с основными антигенами вируса НА и NA от эпидемического родителя.

Благоприятной для успеха получения реассортантных штаммов ЖГВ является ситуация, когда эпидемические вирусы диаметрально отличаются по используемому для селекции признаку от созданного в лаборатории донора аттенуации, то есть неспособны к репродукции при пониженной до 25°C температуре инкубации (*non-ca* фенотип). Метод реассортации для получения аттенуированных штаммов ЖГВ разрабатывался на основе именно таких характеристик «дикого» вируса. Кроме того, устойчивость эпидемического компонента скрещивания к термостабильным ингибиторам сыворотки крови (*ir* фенотип) позволяет избежать неспецифического связывания его гемагглютинина с гипериммунной сывороткой, действие которой направленно против доминирования НА и NA донора.

Температууроустойчивость «дикого» вируса не является селектирующим фактором в скрещивании, но фактически благоприятно отражается на эффективности получения вакцинных клонов. Тогда как *ts* фенотип эпидемического родителя отрицательно влияет на стабильность получения вакцинных реассортантов. При реассортации с донором аттенуации температурочувствительных эпидемических вирусов условия работы полимеразного комплекса температурочувствительного «дикого» вируса приближаются к условиям функционирования полимеразного комплекса донора, что не дает преимуществ в селекции генов, кодирующих внутренние белки донора аттенуации. К тому же, в прикладном аспекте, *ts* фенотип реассортантов – удобный маркер аттенуации полученных клонов, однако он утрачивает свое значение, если эпидемический вирус не способен к репродукции при повышенных температурах и приближается по этому признаку к характеристикам донора аттенуации.

Температурочувствительные мутанты вируса гриппа являются в первую очередь объектом интереса при разработке аттенуированных реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Исследований, посвященных естественной циркуляции температурочувствительных вирусов гриппа человека мало. В процессе продолжительного наблюдения за биологическими свойствами актуальных эпидемических вирусов – кандидатов для получения вакцины – стало ясно, что *non-ts* и *non-ca* фенотип не являются неотъемлемыми характеристиками эпидемических штаммов. Появление в середине 1970-х годов температурочувствительных штаммов А (H3N2) совпало с кардинальными изменениями в эпидемическом процессе при гриппе. Так, до этого момента процесс изменчивости вирусов гриппа происходил синхронно во всем мире, причем появление и распространение новых антигенных вариантов сопровождалось исчезновением ранее циркулировавших штаммов. Начиная с 1974 года, подобная преобладанность более не наблюдалась. Было обнаружено, в том числе нами, на примере изолятов эпидемического сезона 1979/80 года в Москве, что каждый эпидемический сезон

одновременно циркулируют два или даже три антигенных варианта [248, 435]. А с 1977 года одновременно циркулируют вирусы А сероподтипов (H1N1) и (H3N2). Между ними зачастую возникают реассортанты, приобретающие эпидемиологическое значение. Например, выявленные нами реассортанты из эпидемии гриппа в Москве, в сезон 1979/80 года. Кроме того, постоянными этиологическими агентами эпидемий гриппа являются вирусы гриппа В.

Быстрая эволюция вирусов гриппа создает трудности в распознавании и прогнозировании текущей и будущей эпидемиологической угрозы. Одним из основных источников информации о возможных угрозах является изучение истории вируса гриппа как эволюционирующего патогена. Анализ того, как вирус эволюционирует, чтобы уклониться от иммунного ответа, может дать представление о том, как иммунная система взаимодействовала с вирусом в прошлом, и как вирус нацелен меняться в будущем, чтобы избежать элиминации.

Длительная циркуляция вирусов в популяции приводит к значительной их гетерогенности по многим биологическим свойствам, в основе которой лежит приспособление к возрастающему иммунологическому прессу. Непрерывные генетические мутации HA1 со временем приводят к изменению антигенных свойств и являются причиной антигенного дрейфа; анализ сопровождающей антигенный дрейф эволюционной изменчивости обеспечивает значимой информацией об антигенности, патогенности, рецепторсвязывающей специфичности, гликозилировании и других свойствах вирусов.

Нами установлена закономерная волнообразная эволюция признака температурочувствительности вирусов А и В. Выявлены среди современных возбудителей гриппа А и В и природные холодоустойчивые варианты вирусов гриппа.

Вопрос о взаимосвязи степени чувствительности к температуре репродукции и вирулентности эпидемических вирусов окончательно не решен. С одной стороны кажется очевидным, что температурочувствительные вирусы ограничены в возможностях успешной репродукции в нижних отделах бронхов и легких, и ответ организма на инфекцию повышением температура тела, наряду с иммунной защитой, способствует элиминации возбудителя. С другой стороны, характерная для вирусов гриппа высокая мутационная изменчивость в неблагоприятных условиях противодействия организма способна приводить к отбору клонов более приспособленных к условиям существования, наиболее адаптированных к выживанию и трансмиссивности в популяции.

Для лабораторных вирусов гриппа факт корреляции температурочувствительности и аттенуации для человека и животных является хорошо исследованным. Температурочувствительные мутанты с локусами повреждения в генах полимеразного комплекса являются донорами аттенуации для ЖГА. Сравнение природных антигенно

идентичных изолятов, отличающихся по температурочувствительности, также выявило различия в их вирулентности [188, 434].

Проведенный нами ретроспективный анализ фенотипических свойств вирусов гриппа А и В показал, что частота выделения температурочувствительных эпидемических вирусов варьировала в значительных пределах в зависимости от периода пандемического цикла. Начало пандемического цикла вирусов гриппа А всех сероподтипов (H1N1, H2N2, H3N2) характеризовалось появлением вирусов, имеющих не только значительную антигенную новизну, но обладающих выраженным *non-ts* фенотипом, коррелирующим с их высокой вирулентностью. С течением времени циркуляции вирусы проходят этапы волнообразного изменения фенотипа от температуроустойчивого к температурочувствительному, через промежуточный этап циркуляции вирусов, варьирующих по *ts* характеристикам. У вирусов сероподтипа А (H1N1) за 50-летний отрезок времени прослеживается появление четырех спадов активности температуроустойчивых вариантов (1950-е, 1970-е, 1980-е и 2000-е годы). За 48 лет циркуляции вирусов сероподтипа А (H3N2) зарегистрировано пять таких волн. В короткий, всего десятилетний, период циркуляции вирусов сероподтипа А (H2N2) тоже прослеживается тенденция замещения температурорезистентных штаммов вирусами, обладающими *ts* фенотипом.

Подобная картина выявляется и при анализе температурных особенностей репродукции вирусов гриппа В, хотя изменение признака температурочувствительности сильнее растянуто во времени по сравнению с вирусами гриппа А. Ранние вирусы, выделявшиеся до расхождения на две ветви, «Виктория» и «Ямагата», были высоко температуроустойчивыми при 38°C, в то время как современные вирусы гриппа В обеих ветвей стали температурочувствительными уже при 37°C. Отмечено появление только одной волны преобладания температурочувствительных вирусов гриппа В, которое началось в конце 1990-х гг. и продолжается до сих пор. Возможно, это связано с меньшей скоростью эволюции вируса гриппа В, в результате чего он сохраняет на протяжении долгих лет определенную преобладанность как своих антигенных, так и фенотипических признаков.

Анализируя природу высокой температуроустойчивости вирусов гриппа А первых сезонов пандемического цикла, можно предположить, что *non-ts* фенотип они наследуют с генами полимеразного комплекса от вирусов гриппа птиц, в организме которых циркулируют при более высоких температурах. Наряду с антигенной новизной, фактор температуроустойчивости способствует тяжести вызываемых инфекций и вирусным пневмониям. Пандемические вирусы, вероятно, какое-то время сохраняют сродство к Siaα-2,3Gal рецепторам, возможно, проявляя двойную рецепторную специфичность, а это приводит к реализации возможности репродукции *non-ts* вируса в нижних отделах респираторного

тракта. В пользу такого предположения свидетельствует выделение в 1957 году двух вариантов возбудителя пандемии А/Сингапур/1/57 (H2N2) – чувствительного и устойчивого к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади [187]. Возможно более низкая температуроустойчивость вирусов гриппа В объясняется практически облигатным паразитизмом у человека. Вирусы хорошо приспособлены к функционированию в температурном режиме человека.

С адаптацией вирусов гриппа А к людям, у которых они преимущественно репродуцируются в клетках ВДП, происходит перенастройка на температурный режим нового хозяина. Эволюционная задача вируса – распространение в популяции. Для ее реализации паразиту не надо уничтожать хозяина, респираторным путем передачи вирус стабильно распространяется в сообществе. Поэтому температурочувствительные вирусы, при антигенном обновлении, продолжают длительно сохранять способность к циркуляции за счет респираторной трансмиссии.

Как допустимую вероятность можно рассматривать появление за счет эволюционного отбора новых температуроустойчивых вариантов, поскольку вирусы человека, изначально происходящие от вирусов гриппа птиц, имеют генетический потенциал к проявлению *non-ts* фенотипа. Температуроустойчивый вирус, как более сильный патоген, широко распространяется, но постепенно ему на смену опять приходят менее вирулентные варианты.

Эволюция температурочувствительности происходит параллельно с антигенной эволюцией, но независимо от нее. Нами отмечены факты циркуляции антигенно однородных вирусов, различающихся по температурочувствительности. Особенно тяжелые эпидемии возможны при сочетании антигенной новизны и *non-ts* фенотипа.

По-видимому, антигенная приспособляемость вирусов неограничена, и при продолжительной (10-50 лет) циркуляции вирусов одного серотипа возникают предпосылки для появления нового пандемического возбудителя.

Длительная социркуляция температурочувствительных вирусов гриппа А (H1N1, H3N2) и В накануне 2009 года была «маячком», сигнализирующим, что освободившаяся от патогенных вирусов ниша может быть занята новым эпидемически активным или даже пандемическим вирусом. Таким вирусом стал сложный реассортант А (H1N1)pdm2009. Фенотипические свойства нового пандемического штамма соответствуют классическим характеристикам патогенных вирусов: *non-ts/non-ca* фенотип, при этом он обладает устойчивостью к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади и морской свинки.

Таким образом, характеристика по признаку температурочувствительности может способствовать оценке эпидемического статуса циркулирующих вирусов и даже позволяет

предусмотреть появление нового патогенного возбудителя на фоне длительной циркуляции температурочувствительных штаммов.

Другой оцениваемый признак вирусов гриппа – чувствительность к неспецифическим сывороточным ингибиторам. Анализ чувствительности вирусов гриппа к неспецифическим температуроустойчивым ингибиторам сыворотки крови лошади показал различия между вирусами разных сероподтипов А и линий В. Все исследованные вирусы сероподтипа А(Н1N1) проявляют устойчивость к ингибиторам сыворотки крови лошади, это может соответствовать либо их двойственной рецепторной специфичности [12, 229], либо о тому, что специфичность рецептора НА Н1 нечувствительна к ингибированию макроглобулинами сыворотки крови лошади [460]. Среди циркулирующих эпидемических штаммов сероподтипов А(Н2N2) и А(Н3N2) встречаются как устойчивые, так и чувствительные к ингибиторам. При этом характеристика пандемических возбудителей может отличаться. Как уже упоминалось, вирус А/Сингапур/1/57(Н2N2), возбудитель тяжелой пандемии «Азиатского» гриппа, в 1957 году циркулировал в двух вариантах – *is* и *ir*. Возбудитель пандемии Н3N2 А/Гонконг/1/68 по нашим данным и по данным литературы [445] был ингибиторочувствительным, как и его дрейфовый вариант А/Англия/42/72, что, вероятно, обусловлено произошедшей адаптацией к рецепторам ВДП человека.

Вирусы гриппа В, как было показано нами, одновременно с дивергенцией на две ветви, разделились по отношению к ингибиторам на устойчивые «Виктория» и чувствительные «Ямагата», тогда как «ранние» вирусы гриппа характеризовались ингибитороустойчивостью.

Проведенное нами сравнение последовательностей *is* и *ir* вирусов гриппа В, полученных из баз данных, показало наличие по меньшей мере трех аминокислотных позиций в молекуле НА1, которые могут быть связаны с приобретением ингибиторочувствительности вирусами ветви «Ямагата». Исследования рецепторной специфичности вирусов гриппа В двух эволюционных ветвей установило, что вирусы «Ямагата» проявляют сродство к Sia α -2,6Gal рецепторам, тогда как «Виктория»-подобные распознают оба α -2,3 и α -2,6 типа рецепторов [546], чем и объясняется их устойчивость ингибиторам лошадиной сыворотки, выявленная нами.

Для получения вакцинных штаммов вируса гриппа используются актуальные эпидемические вирусы, выделяемые и культивируемые исключительно в РКЭ. Поскольку как эпидемический вирус, так и донор *att*, полностью адаптированы к размножению в куриных эмбрионах, они приобретают специфичные для куриных эмбрионов *host-range* мутации еще до скрещивания, это может происходить уже при единственном накоплении [459].

На клетках хориоаллантаоисной оболочки преобладают α -2,3 рецепторы [230], поэтому культивирование вирусов человека в РКЭ приводит к перенастраиванию с α -2,6 на α -2,3

рецепторное взаимодействие. Соответственно, это может приводить к снижению ингибирования вируса макроглобулинами сыворотки крови лошади [230].

Учитывая вышесказанное, ретроспективный анализ чувствительности к ингибиторам вирусов гриппа человека, культивируемых в РКЭ, не является вполне объективным отражением эволюции признака, а скорее показывает путь приспособления различных штаммов (сероподтипов, линий) вирусов человека к другому хозяину. Если это происходит за счет дополнительных мутаций, обеспечивающих способность вируса использовать рецепторы обоих типов, либо за счет полной перенастройки на α -2,3 тип связи, то вирус не будет ингибироваться лектинами сыворотки крови лошади. Если же вирусы сохраняют чувствительность к ингибиторам, следовательно, они сохраняют α -2,6 тип взаимодействия, вероятно от таких вирусов нельзя ожидать высокой репродуктивности в РКЭ. Этот факт, наряду с описанным в литературном обзоре изменением рецепторных взаимодействий у современных вирусов гриппа А человека (раздел 2.5) приводит к сложности накопления вирусов в РКЭ. Следует оговориться, что мы не наблюдали снижения чувствительности к ингибиторам сыворотки крови лошади у ингибиторочувствительных 6:2 реассортантов, культивируемых в РКЭ. Их ингибиторочувствительный фенотип всегда был идентичен фенотипу исходного, выделенного в РКЭ и адаптированного к РКЭ эпидемического родителя. Вероятно, при культивировании в РКЭ адаптация к клеткам ХАО, имеющим α -2,3-рецепторную специфичность, происходит уже у «дикого» вируса. В таком случае подобная адаптация, вероятно, сопровождается дополнительными мутациями, не затрагивающими α -2,6-рецепторный сайт, что не меняет взаимодействие вируса с лошадиной сывороткой.

Исследованные нами вирусы получены из официальных источников для работы над вакцинными штаммами, либо представляют собой изоляты из локальных эпидемий, они прошли ограниченное число пассажей в РКЭ и находятся приблизительно на одной стадии переадаптации к репродукции *in ovo*. Исходя из этого, выявленные нами различия и закономерности по признаку чувствительности к ингибиторам, можно оценивать не как лабораторный артефакт, а как отражение различий между сероподтипами вирусов гриппа А и линиями вирусов гриппа В.

В оценке роли чувствительности/устойчивости вирусов к ингибиторам сыворотки крови нами рассматриваются два аспекта: (1) влияние на успех подготовки штаммов ЖГВ и (2), что имеет определяющее значение, влияние на качество вакцинного препарата.

(1) Устойчивость эпидемических вирусов к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови способствует успешному и быстрому получению штаммов ЖГВ. Поскольку в процессе подготовки реассортантных штаммов ЖГВ используется гипериммунная сыворотка против донора аттенуации, благоприятно, когда эпидемический вирус устойчив к действию

термостабильных сывороточных ингибиторов, которые не удается полностью убрать прогреванием и обработкой ферментом RDE. Устойчивость эпидемического компонента скрещивания к сывороточным ингибиторам позволяет избежать неспецифического связывания его гемагглютиниона с сывороткой против донора.

В последние годы при реассортации нами отмечается все больше сложностей перехода в состав реассортанта комплекта генов, кодирующих HA и NA эпидемического родителя. Эти осложнения напрямую связаны с *is* фенотипом «дикого» компонента скрещивания. Мы провели сравнительный анализ состава генома 683 реассортантов, полученных на основе 35 эпидемических родительских вирусов, различающихся по признаку ингибиторочувствительности к термостабильным ингибиторам, и доноров аттенуации. Статистически достоверно показано, что вне зависимости от родовой принадлежности эпидемического родителя и вне зависимости от серотипа А (H1N1, H2N2 или H3N2) NA ингибитороустойчивых вирусов встраивалась в геном реассортантов значительно чаще, чем NA ингибиторочувствительных вирусов. Только 19,5% реассортантов на основе ингибиторочувствительных вирусов наследовали NA «дикого» типа, тогда как от ингибитороустойчивых вирусов NA «дикого» типа приобрели 92,2% реассортантов. Известно существование функционального баланса в функционировании белков HA и NA [540]. Gimsa U. и соавторами показали, что инактивация нейраминидазы природно-устойчивых к ингибиторам вирусов гриппа приводила к тому, что эти вирусы теряли способность элюировать с ингибиторов и становились ингибиторочувствительными [245]. Возможно, обнаруженное нами преимущественное наследование реассортантными штаммами *is* HA от «дикого», а *ir* NA – от *att* родителя, связано с особенностями HA и NA «дикого» вируса. Реассортанты с HA ингибитороустойчивого донора аттенуации в процессе скрещивания в селективных условиях нейтрализуются антисывороткой к донору, а его NA, вероятно, имеет определенные преимущества перед NA *is* «дикого» вируса и конкурирует с ней при встраивании в геном реассортанта. Такие конкурентные отношения, вероятно, могут быть объяснены менее слабой ферментативной активностью NA от ингибиторочувствительного вируса гриппа.

Функциональная роль NA в комплексном с HA взаимодействии, влияющем на проявление ингибиторочувствительности/устойчивости показана нами при сравнении реассортантов с формулой генома 6:2 и 7:1, унаследовавшим NA либо «дикого» родителя, либо донора аттенуации. Реассортанты 6:2 и 7:1 из скрещивания ингибитороустойчивых «диких» вирусов с ингибитороустойчивым донором аттенуации демонстрировали в РТГА с неиммунной сывороткой крови *ir* фенотип, не отличающийся от фенотипа родительского «дикого» вируса. Такие же 6:2 и 7:1 реассортанты, только на основе ингибиторочувствительного «дикого» родителя характеризовались существенными различиями в температурочувствительности.

Так, 6:2 реассортанты с HA и NA «дикого» родителя сохраняли равнозначную с родительским вирусом ингибиторочувствительность. В то время как ингибиторочувствительность реассортантов, унаследовавших HA от *is* родителя, а NA от *ir* донора была статистически достоверно снижена в 8-16 раз.

Имеется настороженность, что ингибиторочувствительные штаммы, как обладающие сродством к α -2,6 рецепторам, могут приобретать адаптивные мутации в HA в процессе выделения вируса и получения вакцинных реассортантов в РКЭ, в клетках которых преобладают рецепторы с α -2,3 связью. Кроме того, рецепторсвязывающий карман в структурной единице гемагглютинина расположен рядом с антигенным сайтом, и подобные мутации могут привести к изменению антигенных свойств вируса. Такая ситуация, в частности, произошла с вирусом А/Виктория/361/11(Н3N2), рекомендованным ВОЗ для получения вакцины на 2012/2013 эпидемический сезон. Через год этот штамм был заменен на антигенно родственный А/Техас/50/12 (Н3N2), поскольку при накоплении в РКЭ А/Виктория/361/11 приобрел мутацию, влияющую на его антигенность. [571].

(2) Поскольку вирусы с α -2,6 сиалилгалактозной рецепторной специфичностью имеют сродство к клеткам респираторного тракта человека, следует ожидать, что вакцинный штамм на основе ингибиторочувствительных вирусов будет репродуцироваться в них лучше, чем на основе ингибитороустойчивых вирусов с α -2,3 рецепторной специфичностью, что должно положительно сказываться на иммуногенности вакцинного препарата. Важно, чтобы штаммы ЖГВ также успешно преодолевали богатый ингибиторами муциновый барьер в межклеточных секретах носовых ходов. Есть данные, что слизистые секреты человека содержат α -2,3-терминированные гликаны [195], что также свидетельствует в пользу вакцинных препаратов на основе ингибиторочувствительных вирусов с α -2,6 типом рецепторного взаимодействия. Однако в какой степени неспецифические ингибиторы человека влияют на вакцинный штамм в организме сказать сложно. Количество ингибиторов в крови и секретах варьирует в зависимости от сезона года и индивидуальных особенностей людей.

В литературных источниках нет единого мнения о том, какой штамм *is* или *ir* предпочтительнее для ЖГВ, однако допускается, что ингибитороустойчивые штаммы могут быть предпочтительнее при подготовке вакцины для людей [445].

Из ранних клинических исследований с выделением вирусов от заболевших, был сделан вывод, что устойчивые к ингибиторам сыворотки лошади вирусы вызывают меньше реакций, чем чувствительные к ингибиторам. [504]. Скорее всего, меньше реакций потому, что *ir* вирусы хуже репродуцируются в клетках человека.

Температурочувствительные, а иногда и холодоустойчивые вирусы продолжают оставаться этиологическими агентами эпидемического процесса. Вопрос о патогенности *ts* и *ca*

возбудителей требует отдельного изучения, однако в связи с тем, что они приобретают массовое распространение в популяции и являются причиной вспышек и эпидемий, требованием ВОЗ является подготовка противогриппозных вакцин на их основе. Необходимость использования *sa* вирусов в качестве эталонных штаммов-кандидатов в вакцину нивелирует значение селективного фактора – пониженной температуры, и тем самым осложняет подготовку вакцинных реассортантов.

Сравнивая два метода реассортации классической и генно-инженерной, следует отметить, что конструирование вакцинных штаммов методами обратной генетики не имеет такой проблемы. Однако классическая реассортация обладает определенными преимуществами перед методами обратной генетики, поскольку приводит к естественному отбору вакцинных клонов с высокими репродуктивными возможностями в РКЭ, а это важный показатель для производства, важно только, чтобы высокая репродуктивность в РКЭ не приводила, из-за перенастройки рецепторов, к снижению репродуктивности в клетках респираторного тракта человека. Закрепление спонтанных и адаптивных мутаций в процессе пассажей в РКЭ следует признать недостатком естественной реассортации, однако если мутации не влияют на антигенные и рецепторные детерминанты, или на какие-либо другие существенные характеристики, как например, устойчивость к химиопрепаратам, то на свойствах вакцины это не отразится. Для подтверждения отсутствия нежелательных мутаций обязательным условием является полное секвенирование генома кандидатов в ЖГВ. Обязателен также контроль *ts/ca* фенотипа реассортантов, поскольку теоретической возможности возникновения супрессорных мутаций исключить все же нельзя, хотя многолетние исследования ЖГВ, в том числе исследования, представленные в настоящей работе, таких мутаций ни разу не выявили.

Характеристика варьирующих по фенотипическим особенностям эпидемических вирусов позволила предложить наиболее рациональные методические подходы для успешного получения вакцинных реассортантов. Такие подходы предложено использовать в работе при получении штаммов ЖГВ.

Отдельного внимания заслуживает подготовка вакцинных штаммов на основе вирусов с пандемическим потенциалом. Впервые осуществленное получение штаммов ЖГВ к пандемическому вирусу А(Н1N1pdm2009) и потенциально пандемическому и вирусу гриппа свиней не вызвало затруднений. Эти вирусы обладают классическими характеристиками патогенных штаммов: *non-ts/non-ca* фенотип и полной генетической совместимостью с донором аттенуации, что позволяет эффективно работать маркерам аттенуации. ЖГВ на основе этих вирусов в доклинических испытаниях на лабораторных животных проявили себя аттенуированными, иммуногенными и способными приводить к формированию иммунитета, защищающего от инфекции вирулентным «диким» вирусом.

Для разработки штаммов ЖГВ к потенциально пандемическим высокопатогенным вирусам гриппа птиц сероподтипа А(Н5N1) – А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005 и А/индюк/Турция/1/2005 потребовалась модернизация метода классической реассортации. Поскольку классический путь получения вакцинных реассортантов в куриных эмбрионах с целью создания препаратов ЖГВ к высоковирулентным вирусам гриппа осложнен патогенностью этих вирусов для РКЭ и необходимостью проведения работы в особых условиях безопасности, в настоящем исследовании в качестве источника поверхностных антигенов использовали реассортанты для инактивированных вакцин А/Н5N1/PR8-RG, подготовленные на основе донора высокой урожайности А/PR/8/34 и НРАI вирусов гриппа птиц Н5N1. Модификация сайта рестрикции НА у созданных методами обратной генетики штаммов А/Н5N1/PR8-RG обеспечивает снижение вирулентности Н5 НА. Тактика работы заключалась в замещении генов вируса А/PR/8/34, кодирующих внутренние белки вакцинных А/Н5N1/PR8-RG реассортантов для ИГВ, на гены донора аттенуации для ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2).

В результате скрещивания вирусов А/Н5N1/PR8-RG с донором аттенуации А17 были получены 7:1 реассортанты, содержащие единственный ген НА Н5 от вирусов птиц, а остальные гены от донора аттенуации. Классические для ЖГВ 6:2 реассортанты получить не удалось, несмотря на многочисленные попытки и разнообразие примененных приемов. Ген НА N1 птичьего вируса не встраивался в реассортантный геном, что, вероятно, является проявлением ограничений констелляции генов у дальнородственных вирусов разных хозяев. Неудача с попыткой получения вакцинных штаммов Н5N1 с формулой генома 6:2 методом классической реассортации в случае получения реассортантов для ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа, возможно, сказалась во благо. Представляется, что формула генома 7:1 вакцинного штамма ЖГВ против высокопатогенных и пандемически опасных вирусов гриппа птиц сероподтипа Н5N1 имеет свои преимущества: присутствие в вакцинном штамме еще одного гена от донора аттенуации (NA) является дополнительной гарантией его безопасности. Кроме того, именно антитела к НА вируса гриппа являются вируснейтрализующими, а поэтому наиважнейшим компонентом протекции, роль антител к NA связана с ограничении распространения вируса, что важно, но менее существенно [415].

Доклинические испытания ЖГВ на основе 7:1 Н5N2 реассортантов на хорьках и I фаза клинических исследований на ограниченном контингенте добровольцев показали их высокую аттенуацию и иммуногенность. Они также обеспечивали эффективную защиту животных от инфекции как гомологичными, так и гетерологичными высокопатогенными вирусами гриппа птиц.

Таким образом, показана возможность подготовки ЖГВ из потенциально пандемических вирусов гриппа птиц с целью ее дальнейшего использования для защиты людей в случае наступления пандемии птичьего гриппа.

Для быстрой и эффективной подготовки штаммов ЖГВ были модернизированы экспресс-методы оценки состава генома реассортантов. Был частично изменен метод RFLP анализа вирусов гриппа А, подобраны новые праймеры и рестриктазы, позволяющие анализировать вирусы гриппа В обеих эволюционных ветвей «Виктория» и «Ямагата».

Разработан еще более быстрый метод анализа состава генома на основе ПЦР-продуктов, различающихся по молекулярной массе – мультиплекс (микс)-ПЦР. Праймеры подобраны таким образом, чтобы в сравниваемой паре генов донора и второго родительского вируса амплифицировался только один из них по принципу «да-нет». Этот метод позволяет также оценивать чистоту клонов, если при амплификации добавить одновременно праймеры для обоих родителей.

РАЗДЕЛ III

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Мутантные гены полимеразного комплекса доноров аттенуации А и В для отечественной ЖГВ играют определяющую роль в аттенуации холодоустойчивых реассортантов, полученных на их основе.

За температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отвечают мутантные гены донора PB2, PB1 и PA, как совместно, так и попарно при обязательном участии гена PB2.

Мутантные гены PB2 и PA донора аттенуации В/СССР/60/69 независимо друг от друга обеспечивают формирование *ts* фенотипа реассортантов. Мутация в гене PB1 приводит к усилению температурочувствительности клона из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69. За проявление *sa* фенотипа ответственны мутации в гене PA.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [48, 55, 57, 337].

2. Выявлены закономерности эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности (*ts*) репродукции. Продемонстрирован волнообразный (циклический) характер изменения признака устойчивости/чувствительности к температурам, превышающим физиологический оптимум, и проведена связь этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов.

Эволюция вируса гриппа по признаку температурочувствительности позволяет точнее оценивать эпидемические потенциалы вновь появляющихся штаммов и заблаговременно формировать более обоснованный прогноз ожидаемой заболеваемости гриппом.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [17, 18, 46, 47, 49, 51, 248, 333, 335].

3. Выявлены различия между вирусами гриппа В антигенных ветвей В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных, по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови. Вирусы эволюционной ветви «Виктория» сохранили устойчивость к неспецифическим термостабильным ингибиторам, присущую ранним известным вирусам гриппа В, а вирусы эволюционной линии «Ямагата» приобрели высокую ингибиторочувствительность.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [49, 54].

4. Аттенуированные реассортантные штаммы ЖГВ на основе отечественных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69/525, и пандемического вируса гриппа А(H1N1)2009, вируса гриппа свиней А(H3N2)v сезонных штаммов являются

генетически стабильными, аттенуированными и высокоиммуногенными для лабораторных животных.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [50, 52, 53, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 70, 84-102, 248, 249, 334, 336, 338, 339, 341, 342, 345, 350].

5. Залогом успешного формирования вакцинных реассортантов с формулой генома 6:2, со стабильной передачей гена NA реассортанту от эпидемического родителя, является резистентность эпидемических родительских вирусов гриппа А и В к неспецифическим ингибиторам нативной сыворотки крови.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [64, 65, 69].

6. Продемонстрировано влияние нейраминидазы устойчивого к сывороточным ингибиторам донора аттенуации на снижение уровня ингибиторочувствительности гемагглютинина вирусов гриппа А и В у реассортантов с формулой генома 7:1, наследующих NA и NA от разных родителей. Выявленная закономерность является свидетельством комплексного участия гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам и опосредованным указанием на взаимное участие белков NA и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.

Исследования этого раздела работы отражены в следующих публикациях: [346, 347].

7. Разработан новый методический подход к получению штаммов аттенуированной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) на основе высокопатогенных вирусов гриппа А (H5N1) и генно-инженерных А(H5N1)-PR8 штаммов для инактивированной вакцины, позволяющий проводить реассортацию в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и безопасный для персонала.

Выявлены ограничения в способности к реассортации *ts/ca* вируса гриппа человека А (H2N2), и генно-инженерных А(H5N1)-PR8 штаммов, имеющих гемагглютинин H5 и нейраминидазу N1 птичьего вируса гриппа и внутренние белки вируса А/PR8/34 (H1N1).

В результате естественного скрещивания в РКЭ не удастся получить реассортанты с вакцинной формулой генома 6:2, которые наследовали бы гемагглютинин H5 (НА) и нейраминидазу N1(NA) птичьего вируса гриппа и основу из внутренних белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Любые варианты наследования N1 птичьего вируса сопровождались включением в состав реассортанта как минимум гена PB2, происходящего от А/PR8/34. И наоборот, встраивание в геном реассортанта гена PB2 донора аттенуации влечет за собой передачу реассортанту донорской NA. При этом исследования свидетельствуют, что 6:2 реассортанты, полученные методами обратной генетики, являются полноценными и высоко репродуктивными, как и все прочие реассортанты для ЖГВ.

Скрещивание донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с А(H5N1)-PR8 штаммами дает возможность получать температурочувствительные, холодоустойчивые,

аттенуированные для лабораторных животных и человека реассортанты только с формулой генома 7:1, которые наследуют от высокопатогенных вирусов гриппа птиц единственный ген НА(Н5).

Поскольку в гемагглютinine HA1 штаммов А(Н5N1)-PR8 для снижения патогенности вырезан полиосновный фрагмент, то, наследуя от патогенного Н5N1 родителя единственный «усеченный» ген НА, Н5N2 ЖГВ приобретают дополнительные аттенуирующие свойства, что может расцениваться благоприятно при вакцинации живыми гриппозными вакцинами к высокопатогенным вирусам.

8. Доклиническая характеристика А (Н5N2) ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А/индюк/Турция/1/2005 (Н5N1) и А/Вьетнам/1203/2004 (Н5N1) показала их аттенуацию для лабораторных животных (хорьков, цыплят), высокую иммуногенность и протективную активность для хорьков.

Исследования 6-го и 7-го раздела работы отражены в следующих публикациях: [67, 340, 343, 344].

9. Результаты доклинических исследований позволили перейти к изучению свойств 7:1 вакцины А/17/индюк/Турция//133 (Н5N2) на людях. Показаны высокая приживляемость вакцинного вируса у привитых добровольцев, отсутствие трансмиссивности непривитым лицам группы плацебо, сохранность *ts/ca* фенотипа и генетическая стабильность аттенуирующих мутаций в реизолятах вакцинного вируса от привитых. Изоляты вакцинного вируса А/17/индюк/Турция/05/133 (Н5N1) от привитых добровольцев стабильно сохраняют присущие донору аттенуации мутации и *ts/ca* фенотип. Эти исследования вносят новый вклад в многолетние наблюдения за свойствами штаммов ЖГВ на основе отечественных доноров аттенуации, и демонстрируя что высокая генетическая и фенотипическая стабильность холодоадаптированных вакцинных реассортантов имеет универсальный характер и присуща не только штаммам ЖГВ на основе эпидемических вирусов гриппа человека, но и на основе не изученных ранее высокопатогенных вирусов гриппа птиц сероподтипа Н5N1.

Исследования этого раздела работы отражены в публикации: [348].

10. Проведена оценка особенностей реассортации современных штаммов вирусов гриппа. Продемонстрировано, что фенотипические свойства эволюционирующих вирусов гриппа, отличающиеся от классических вирулентных вирусов, осложняют получение вакцинных 6:2 реассортантов. Предложены методические подходы для успешного получения штаммов ЖГВ на основе вирусов гриппа, обладающих разными биологическими характеристиками.

Исследования этого раздела работы отражены в публикации: [68].

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации. На основании результатов диссертационного исследования планируется провести анализ роли выявленных мутаций донора В/СССР/60/69 в аттенуации с помощью реконструирования донора методами обратной генетики и введения в его гены определенных нуклеотидных замен. Исследование влияния аминокислотных замен в гемагглютинине, связанных с адаптацией к куриным эмбрионам, на рецепторные взаимодействия штаммов ЖГВ с клетками млекопитающих и индукцию иммунного ответа даст направление путей усовершенствования ЖГВ. Выявление мутаций, связанных с природной температурочувствительностью изолятов, позволит исследовать молекулярные основы этого признака, их эволюцию и, возможно, эпидемические потенции вирусов гриппа. При получении новых реассортантных штаммов для ЖГВ предполагается использовать приведенные в диссертационном исследовании рекомендации.

ВЫВОДЫ

1. Гены, кодирующие белки полимеразного комплекса холодоадаптированных доноров аттенуации А и В, играют определяющую роль в аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины, полученных на их основе.

За температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отвечают разные комбинации его генов PB2, PB1 и PA при обязательном участии гена PB2. У донора аттенуации В/СССР/60/69 мутантные гены PB2 и PA обеспечивают формирование температурочувствительного фенотипа реассортантов независимо друг от друга. Дополнительная мутация Pe-644-Val в гене PB1 одного из клонов исходной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69 приводит к повышению его температурочувствительности. За проявление *ca* фенотипа донора аттенуации В/СССР/60/69 ответственен мутантный ген PA.

2. Эволюция признака температурочувствительности репродукции вирусов гриппа А и В подвержена закономерной цикличности. В смене температурочувствительного фенотипа вирусов прослеживается связь с изменением их эпидемических потенций.

3. Выявлены различия между В/Виктория/2/87- и В/Ямагата/16/88-подобными вирусами гриппа по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади. Вирусы эволюционной ветви «Виктория» сохранили устойчивость к неспецифическим термостабильным ингибиторам, присущую вирусам, циркулировавшим до дивергенции на две ветви, а «Ямагата»-подобные вирусы приобрели высокую ингибиторочувствительность.

4. Показано наличие прямой зависимости эффективности наследования реассортантами гена, кодирующего нейраминидазу эпидемического родительского вируса, от его ингибиторостойчивости при скрещивании с донорами аттенуации.
5. Продемонстрировано комплексное участие гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении их чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам. Выявленный феномен является опосредованным указанием на взаимное участие белков НА и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.
6. Предложены модификации метода получения вакцинных штаммов, способствующие эффективной разработке реассортантов для живой гриппозной вакцины на основе современных вирусов гриппа, различающихся по биологическим свойствам.
7. Впервые метод классической реассортации применен для разработки живой гриппозной вакцины на основе пандемического вируса гриппа А (H1N1)pdm09 и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Родительские вирусы легко вступали в реассортацию, а *non-ts/non-ca/ir* фенотип пандемического вируса А (H1N1)pdm09 позволил успешно и в кратчайшие сроки получить 6:2 реассортант для живой гриппозной вакцины.
8. Разработан метод получения реассортантов для живой гриппозной вакцины в системе развивающихся куриных эмбрионов на основе высоковирулентных потенциально пандемических вирусов гриппа птиц А(H5N1) и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Использование в качестве источника гена НА реассортантных штаммов для инактивированных вакцин А(H5N1)-PR8-RG, аттенуированных за счет удаления полиосновного сайта рестрикции, позволяет получать реассортанты, по свойствам температурочувствительности, холодоустойчивости, безвредности и иммуногенности для лабораторных животных соответствующие всем критериям, предъявляемым к вакцинным штаммам живой гриппозной вакцины.
9. Реассортантные штаммы на основе холодаадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и В/СССР/60/69/525 не только для сезонных, но и пандемических и зоонозных потенциально пандемических живых гриппозных вакцин полностью сохраняют аттенуирующий фенотип, присущий донорам аттенуации.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

A17		донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)
а.к.		аминокислота
белки вируса гриппа	PB2	белок полимеразного комплекса (polymerase basic 2)
	PB1	белок полимеразного комплекса (polymerase basic 1)
	PA	белок полимеразного комплекса (polymerase acid)
	HA	гемагглютинин
	NP	нуклеопротеин
	NA	нейраминидаза
	M	матриксный белок
	M1	матриксный белок 1
	M2	матриксный белок 2
	NS	неструктурный белок
	NS1	неструктурный белок 1
	NS2	неструктурный белок 2, теперь NEP
NEP		белок ядерного экспорта (nuclear export protein)
БОЕ		бляшкообразующие единицы вируса
B60,		донор аттенуации В/СССР/60/69
B60/525		клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69/525
ВДП		верхние дыхательные пути
	в/м	внутримышечно
	и/н	интраназально
	п/к	подкожно
Введение препарата	в/д	внутридермально
ВОЗ		Всемирная организация здравоохранения
ВШ		Вакцинный штамм
ГАЕ		гемагглютинирующие единицы
ЖГВ		живая гриппозная вакцина
ИГВ		инактивированная гриппозная вакцина
ПЦР		полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction)
н.и.		не исследовали
РГА		реакция гемагглютинации
РКЭ		развивающиеся куриные эмбрионы
РТГА		реакция торможения гемагглютинации
Реассортантные штаммы А(H5N1) для вакцины инактивированной, 6 генов от А/PR/8/34 -донора высокой репродуктивности	A/H5N1/PR8-RG	обобщенное обозначение этой группы реассортантов
	NIBRG-23 (H5N1)	гены HA и NA от HPAIV А/индюк/Турция/1/05
	INDO/05 (H5N1)	гены HA и NA от HPAIV А/Индонезия/5/05
	VN1203 (H5N1)	гены HA и NA от HPAIV А/Вьетнам/1203/04
СТТ		среднегеометрический титр
Фенотип вируса	<i>att</i>	аттенуированный (attenuated)
	<i>ca</i> , ХА	холодоадаптированный (cold-adapted)
	<i>non-ca</i>	холодоустойчивый
	<i>is</i> , ИЧ	чувствительный к ингибиторам неиммунной сыворотки крови

	<i>ir</i> , ИУ	устойчивый к ингибиторам неиммунной сыворотки крови
	<i>ts</i> , ТЧ	температурочувствительный (temperature sensitive)
	<i>non-ts</i>	температууроустойчивый
ХАО		хориоаллантоисная оболочка
ЭИД ₅₀		50%-ная эмбриональная инфицирующая доза вируса
A(H3N2)v		сероподтип вируса гриппа свиней (v - variant)
HPAIV, HPAI		высоко патогенный вирус гриппа птиц (highly pathogenic avian influenza virus)
LPAIV, LPAI		низко патогенный вирус гриппа птиц (low pathogenic avian influenza virus)
MDCK		перевиваемая линия клеток почек собаки
PBS		фосфатно-буферный раствор (phosphate buffer saline)
p/i.		после заражения (post infection)
RBS		сайт связывания рецептора (receptor binding site)
RCT _{40(38),25}		разница в титрах репродукции вируса при оптимальной и повышенной/пониженной температурах (reproductive capacity at different temperatures)
RDE		разрушающий рецепторы фермент (receptor-destroying enzyme)
RFLP		полиморфизм длин фрагментов рестрикции (restriction fragment length polymorphism)
RG		обратная генетика (reverse genetic)
PR8		вирус A/PR/8/34 (H1N1)
WT		«дикий», эпидемический вирус (wild type)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Г.И. Реактогенные и иммуногенные свойства и эпидемиологическая эффективность дополнительно ослабленных вакцинных штаммов вируса гриппа (наблюдения над детьми дошкольного возраста) / Г.И. Александрова, Б.А. Микуцкая, Р.А. Плешанова и др. // Вопр. вирусол. - 1965. - 1. - С. 67-69.
2. Александрова, Г.И. Этиология, иммунология и специфическая профилактика гриппа (разработка живой вакцины против гриппа для детей) : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 03.00.06 / Александрова Галина Ибрагимовна. - Л., 1969. - 34 с.
3. Александрова, Г.И. Живая гриппозная вакцина для детей. (Итоги лабораторных и эпидемиологических испытаний в 1961-70 гг) / Г.И. Александрова, Р.П. Шапошникова, А.А. Смородинцев // Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей. - Л., 1971. - С. 21-45.
4. Александрова, Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа / Г.И. Александрова // Вопр. вирусол. - 1977. - 4. - С. 387-395.
5. Александрова, Г.И. Живая вакцина против гриппа / Г.И. Александрова, А.И. Климов - СПб: Наука, 1994. - 152 с.
6. Александрова, Г.И. Аттenuированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа, используемый для производства живой интраназальной гриппозной вакцины [Текст]. Патент 2078817 РФ, МПК C12N7/00. Заявитель и патентообладатель НИИЭМ СЗО РАМН. - №92006181/13; заявл. 27.11.1992; опубл. 10.05.97.
7. База данных сиквенсов вирусов гриппа. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.flu.lanl.gov>.
8. База данных сиквенсов вирусов гриппа. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi>.
9. База данных сиквенсов вирусов гриппа. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://influenza.genomics.org.cn/search/complexQuery.jsp>.
10. Бектемиров, Т.А. Сравнительное изучение штаммов вируса атипичной чумы птиц (болезни Ньюкастла) различной вирулентности в культурах куриных эмбриональных тканей / Т.А. Бектемиров, И.М. Соккар // Вопр. вирусол. - 1963. - 3. - С. 330-338.
11. Васильева, Р.И. Профилактика гриппа у детей. Сообщение 1. Опыт применения живых гриппозных вакцин / Р.И. Васильева, М.П. Зыков, И.Д. Кулиш, Л.Е. Камфорин // Эпидемиология и профилактика гриппа. - Л., 1980. - С. 54-69.

12. Гамбарян, А.С. Какие адаптационные изменения в гемагглютинине и нейраминидазе нужны для возникновения пандемического вируса гриппа из птичьего предшественника / А.С. Гамбарян, М.Н. Матросович // Биохимия. - 2015. - 80 (7). - С. 1040-1048.
13. Гармашова, Л.М. Холодоадаптированный штамм А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) - специальный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей и полученные на его основе рекомбинанты / Л.М. Гармашова, Ф.И. Полежаев, Г.И. Александрова // Вопр. вирусол. - 1984. - 1. - С. 28-31.
14. Гармашова, Л.М. Различия в температурном диапазоне репродукции вирулентных и аттенуированных холодоадаптированных вирусов гриппа А / Л.М. Гармашова, М.И. Гущина, А.Ю. Егоров и др. // Вопр. вирусол. - 1989. - 4. - С. 411-415.
15. Гендон, Ю.З. Характеристика генома некоторых рекомбинантов вируса гриппа / Ю.З. Гендон, А.И. Климов, Э. Тучкова // Молекулярная биология вируса гриппа. - М., 1979. - 26-33 с.
16. Гендон, Ю.З. Массовая вакцинация детей снижает заболеваемость гриппом невакцинированного населения // Педиатрическая фармакология. - 2007. - 4 (3). - С. 70-72.
17. Городкова (Ларионова), Н.В. К вопросу о происхождении эпидемических штаммов вируса гриппа / Н.В. Городкова (Ларионова), А.К. Климов // Известия АН Латв ССР. - 1983. - 5. - С. 71-77.
18. Городкова (Ларионова), Н. Сравнительный анализ геномов эпидемических штаммов вирусов гриппа / Ю. Гендон, А. Климов, Н. Городкова (Ларионова), Л. Деннер, А. Тихонова // Мол. генетика, микробиол. вирусол. - 1984. - 12. - С. 24-29.
19. Григорьева, Е.П. Современное состояние вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины / Е.П. Григорьева, Е.М. Дорошенко, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2005. - 4 (23). - С. 13-17.
20. Григорьева, Е.П. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вируса гриппа / Е.П. Григорьева, В.П. Дриневский, Е.М. Дорошенко и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2009. - 1. - С. 45-53.
21. Гринбаум, Е.Б. Этиологический надзор за гриппом в системе всесоюзного центра по гриппу и ОРЗ / Е.Б. Гринбаум, М.А. Гордон, О.М. Литвинова и др. // Этиология и диагностика гриппа и ОРЗ. - Л., 1986. - С. 23-28.
22. Гущина, М.И. Получение холодоадаптированных рекомбинантных штаммов для живой гриппозной вакцины типа А : дис. ...канд. мед. наук : 03.00.06 / Гущина Марина Ивановна. Л. - 1989.

23. Демидова, С.А. Выделение и изучение вирусов гриппа А на разных клеточных культурах / С.А. Демидова, В.Н. Гадашевич, Ф.М. Кириллова и др. // Вопр. вирусол. - 1979.- 4.- С. 346-350.
24. Дехтярева, Н.И. Генетические признаки вирулентных и аттенуированных штаммов вируса гриппа А, пассированных при оптимальной и пониженной температуре / Н.И. Дехтярева, Т.Е. Медведева // Проблемы гриппа и ОРЗ - Л., 1976. - Т.15. - С. 70-77.
25. Дешева, Ю.А. Изучение безвредности, генетической стабильности и иммуногенности живой гриппозной вакцины для взрослых при вакцинации детей 3-6 лет / Ю.А. Дешева, Г.В. Данини, Е.П. Григорьева и др. // Вопр. вирусол. - 2002. - 4. - С. 21-24.
26. Дешева, Ю.А. Определение состава генома реассортантных холодоадаптированных штаммов вируса гриппа В методом рестриктазного анализа / Ю.А. Дешева, Л.Г. Руденко, А.И. Климов // Вопр. вирусол. - 2007. -52 (3). - С. 16-19.
27. Дешева, Ю.А. Пути усовершенствования живой гриппозной вакцины и тактики ее применения при подготовке к пандемии : дис. ...д-ра мед. наук : 03.00.06 / Дешева Юлия Андреевна. - СПб, 2009. - 314 с.
28. Дубровина, И.А. Живая гриппозная вакцина для детей и взрослых: трансмиссивность в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, И.В. Киселева и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - 6. - С. 14-18.
29. Егоров, А.Ю. Высокорепродуктивные температурочувствительные рекомбинанты вируса гриппа А / А.Ю. Егоров, К.В. Лисовская // Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекции. - Л., 1986. - С. 117-124.
30. Ермаченко, Т.А. Характеристика реассортантов вируса гриппа А, полученных при скрещивании эпидемических вирусов гриппа А (H3N2) 1985-86 годов с холодоадаптированным донором аттенуации А/Ленинград/134/57/17 (H2N2) / Т.А. Ермаченко, Н.Е. Горев, Т.Е. Медведева и др. // Генетическая инженерия иммуномодуляторов и вакцинных препаратов. - Л., 1989. - С. 114-127.
31. Жилова, Г.П. Актуальные задачи вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины // В кн.: Вакцины и вакцинация против гриппа. Труды ВНИИ гриппа МЗ СССР Л., 1985. - С. 5-14.
32. Закстельская, Л.Я. Токсичность вируса гриппа / Л.Я. Закстельская. - М.: изд. АМН СССР, 1953. - 84 с.
33. Иванова, В.Т. Характеристика штаммов вируса гриппа А(H3N2) в эпидемическом сезоне 2003-2004 гг. в России / В.Т. Иванова, Е.И. Бурцева, А.Н. Слепушкин и др. // Вопр. вирусол. - 2006.- 1.- С. 19-23.

34. Иванова, Н.А. Характеристика возбудителей различных заболеваний по ts- признаку / Н.А. Иванова, Е.Б. Гринбаум, А.Ю. Тарос // Этиология и диагностика гриппа и других ОРЗ. -Л., 1982. - С. 138-142.
35. Ивахов, И.Д. Ts мутации вируса гриппа А (H1N1) антигенной разновидности А/Тайвань/1/86 и их взаимосвязь с биологическими свойствами / И.Д. Ивахов, Ф.И. Полежаев, Е.Б. Гринбаум и др. // Молекулярная вирусология и медицинская биотехнология. - Л., 1990. - С. 76-82.
36. Исакова-Сивак, И.Н. Получение и характеристика вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(H2N2) / И.Н. Исакова-Сивак, В.А. Кузнецова, Т.А. Смолоногина, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. Приложение 9. - 2012. - С. 321-323.
37. Киселева, И.В. Основы аттенуации вируса гриппа : дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06 / Киселева Ирина Васильевна. - СПб., 2001. - 224 с.
38. Киселева, И.В. Анализ мутаций в геноме холодоадаптированных штаммов вируса гриппа А с использованием расширенной модификации ПЦР-рестрикционного метода / И.В. Киселева, А.И. Климов // Вопр. вирусол. - 2002. - 47. - С. 24-26.
39. Киселева, И.В. Штамм вируса гриппа А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов // Патент РФ № 2183672 Оpubл. БИ 2002.- №17.
40. Киселева, И.В. Штамм вируса гриппа А/17/Панама/99/242(H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов // Патент РФ № 2248395 Оpubл. БИ 2005.-№8.
41. Киселева, И.В. Генетический и фенотипический анализ гетерогенной популяции холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе / И.В. Киселева, А.И. Климов, Е.П. Григорьева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // Вопр. вирусол. - 2005, - 2. - С. 14-18.
42. Ковалева, Т.П. Биологические свойства двух штаммов аденовируса серотипа 4 / Т.П. Ковалева, Т.И. Юрлова, В.К. Болдасов и др. // Вопр. вирусол. -1971. - 6. - С. 700-703.
43. Константинова, И.И. Изучение ts-фенотипа эпидемических вирусов гриппа А (H1N1) после пассажей в куриных эмбрионах и у добровольцев / И.И. Константинова, Г.П. Жилова под ред. Г.И. Карпухина // Этиология и диагностика гриппа и ОРЗ - Ленинград, 1986. - С. 155-156.

44. Кореньков, Д.А. Сравнительный иммуноэпитопный анализ нуклеопротеинов современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для живой гриппозной вакцины / Д.А. Кореньков, И.Н. Исакова-Сивак, В.А. Кузнецова и др. // *Фундаментальные исследования*. - 2014. - 10. - С. 908-912.
45. Кудрявцева, В.К. Характеристика вируса гриппа А (H3N2) разновидности А/Виктория/35/72, выделенного в межэпидемический период 1986 года / В.К. Кудрявцева, Е.Б. Гринбаум, Г.Н. Неведомская и др. // *Эпидемиологический надзор за гриппом и прогнозирование эпидемий*. - Л., 1987. - С. 126-131.
46. Ларионова, Н.В. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, О.М. Литвинова, В.В. Иванова, И.Н. Исакова, Т.Е. Медведева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // *Медицинский Академический Журнал*. - 2002. - 2 (3).- С. 49-57.
47. Ларионова, Н.В. Температурочувствительность эпидемических вирусов гриппа А как возможный маркер иммуногенности реассортантных вакцинных штаммов / И.В. Киселева, Е.П. Григорьева, А.Н. Найхин, В.В. Иванова, Н.В. Ларионова, С.А. Дониная, О.М. Литвинова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // *Вопр. вирусол.* - 2003. - 4. - С. 26-29.
48. Ларионова, Н.В. Генетический и фенотипический анализ гетерогенной популяции холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе/ И.В. Киселева, А.И. Климов, Е.П. Григорьева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // *Вопр. вирусол.* - 2005. - 2. - С. 14-18.
49. Ларионова, Н.В. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В разных лет выделения / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.Н. Исакова, О.М. Литвинова, Л.Г. Руденко // *Вопр. вирусол.* - 2006. - 5. - С. 38-41.
50. Ларионова, Н.В. Генетическая стабильность холодоадаптированных вирусов гриппа / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, И.Н. Исакова, Л.Г. Руденко // *Вопр. вирусол.* - 2006. - 4. - С. 13-16.
51. Ларионова, Н.В. Фенотипические особенности вирусов гриппа А(H3N2), выделенных в период одной эпидемии / М.Г. Сдобнова, Н.В. Ларионова // *Человек и его здоровье: материалы 79-ой конференции СНО СПбГМА им. И.И. Мечникова*. - Санкт-Петербург, 2006. - С. 338-340.
52. Ларионова, Н.В. Лабораторные маркеры аттенуации вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины / И.Н. Исакова, И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.С. Олейник, Л.Г. Руденко // *Вопр. вирусол.* - 2007. - 52 (4). - С. 22-26.

53. Ларионова, Н.В. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированными вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK / И.В. Киселева, И.Н. Исакова, Н.В. Ларионова, Е.С. Олейник, Л.Г. Руденко // ЖМЭИ. - 2007. - 6. - С. 40-45.
54. Ларионова, Н.В. Характеристика ингибиторочувствительности вирусов гриппа типов А и В разных лет выделения / Н.А. Степанянц, Н.В. Ларионова // XXXV неделя науки СПбГПУ 20-25.11. 2006 г., часть IV: материалы межвузовской научной конференции СПбГПУ. - 2007. - С. 22-23.
55. Ларионова, Н.В. Генетические основы аттенуации холодоадаптированных вирусов гриппа / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.П. Григорьева, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2008. - 3. - С. 15-27.
56. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина, итоги разработок и перспективы применения / Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.Н. Исакова-Сивак // Медицинский Академический Журнал. - 2010. - 4 (10). - С. 235-239.
57. Ларионова, Н.В. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины А и В / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, S.K.M. Drieszen-van der Cruijzen, J.G.M. Heldens, J.F. Van den Bosch, Л.Г.Руденко // ЖМЭИ. - 2010. - 6. - С. 41-47.
58. Ларионова, Н.В. Трансмиссивность вируса гриппа (экспериментальные данные) / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.А. Баженова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Е.П. Григорьева, С.А. Дониная, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2010. - 10 (4). - С. 240-248.
59. Ларионова, Н.В. Метод рестрикционного анализа состава генома штаммов живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, L.C.P.Teley, Л.Г. Руденко // Вопр. вирусол. - 2011. - 3. - С. 28-32.
60. Ларионова, Н.В. Анализ состава генома штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, Н.В. Ларионова, И.А. Дубровина, Ж.А. Бердыгулова, Е.А. Баженова, Н. van denBosch, J.G.M. Heldens, Л.Г. Руденко // Мол. генетика, микробиол. вирусол. - 2011. - 4. - С. 29-36.
61. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина из реассортантного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) - эффективный препарат для профилактики пандемического гриппа / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, А.Н. Миронов, Д.С. Бушменков, С.А. Дониная, Г.Д. Петухова, Д.А. Кореньков, А.Н. Найхин, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2011. - 11 (4). - С. 3-12.

62. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина для детей и взрослых: трансмиссивность в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, И.В. Киселева, Ж.А. Бердыгулова, Н.В. Ларионова, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - 6. - С. 14-18.
63. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина для детей и взрослых: Трансмиссивность вакцины в наблюдениях на детях 3-6 лет / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Е.П. Григорьева, И.Н. Исакова-Сивак, С.А. Дониная, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2012. - 1. - С. 25-29.
64. Ларионова, Н.В. Проблемы подготовки вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины на основе потенциально пандемических вирусов гриппа / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2012.- 6. - С. 16-20.
65. Ларионова, Н.В. Реассортация эпидемических и вакцинных штаммов вируса гриппа в эксперименте / Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, Е.В. Иванова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко. // Юбилейный сборник, посвященный 45-летию НИИ гриппа. Грипп, эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение. СПб, 2012. С. 28-38.
66. Ларионова, Н.В. Изучение возможности реассортации эпидемических и вакцинных штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, Е.А. Федорова, Е.В. Иванова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева // Медицинский Академический Журнал. - 2012. - 12 (4). - С. 45-47.
67. Ларионова, Н.В. Разработка и клиническое изучение отечественной живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа / Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак, А.Н. Найхин, Ю.А. Дешева, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, М.А. Стукова, М.К. Ерофеева, А.Н. Никифорова, А.Н. Миронов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2013. - 71 (4). - С. 74-81.
68. Ларионова, Н.В. Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко // Вопр. вирусол. - 2013. - 5. - С. 26-31.
69. Ларионова, Н.В. Факторы, влияющие на иммуногенность вируса гриппа и гриппозных вакцин / Е.А. Федорова, И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.П. Григорьева, С.А. Дониная, Е.А. Баженова, И.А. Дубровина, М.К. Ерофеева, В.П. Дриневский, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2014. - 3 (76). - С. 70-83.

70. Ларионова, Н.В. Оценка генетической и фенотипической стабильности живой гриппозной вакцины против потенциально пандемического вируса гриппа птиц / И.В. Киселева, И.А. Дубровина, Н.В. Ларионова, И.Н. Исакова-Сивак, Е.А. Федорова, Е.А. Баженова, М.А. Стукова, М.К. Ерофеева, Л.Г. Руденко // *Фундаментальные исследования*. - 2014. - 11 (6). - С. 1301-1305.
71. Литвинова, О. М. Характеристика поверхностных антигенов вирусов гриппа H0N1, выделенных в 1981 году / О.М. Литвинова, В.К. Симановская, С.С. Галитаров и др.; под ред. Г.И. Карпухина // *Этиология и диагностика гриппа и ОРЗ* - Ленинград, 1986. - С. 33-41.
72. Маринич, И.Г. Социальные аспекты эпидемического процесса при гриппе и других острых респираторных заболеваниях в России: Отчёт об исследовании / И.Г. Маринич, Л.С. Карпова, Е.А. Смородинцева - ГУ НИИ Гриппа РАМН. - 2009. - 112с.
73. Маркушин, С.Г. Механизмы изменчивости в процессе пассажей в культуре тканей при пониженной температуре. III. Изменчивость вируса ящура / С.Г. Маркушин, Ю.З. Гендон // *Acta Virol.* - 1967. -11 (2). - С. 100-107.
74. Маркушин, С.Г. Молекулярные механизмы реверсий к ts+ фенотипу холодоадаптированных штаммов вируса гриппа А - доноров аттенуации для живых гриппозных реассортантных вакцин / С.Г. Маркушин, И.И. Аكوпова, И.Б. Коптяева и др. // *Вопр. вирусол.* - 2006. - 5. - С. 17-22.
75. Медведева, Т.Е. Сравнительная характеристика gct₄₀ и S генетических признаков вакцинных штаммов вируса гриппа и их корреляция с уровнем вирулентности для взрослых и детей / Т.Е. Медведева, В.Э. Гольдфарб, С.Л. Немзер и др. // *Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей*. - Л., 1971. - С. 195-208.
76. Медведева, Т.Е. Проблемы гриппа и ОРЗ: реактогенные и иммуногенные свойства вируса гриппа А/Ленинград/538/74 на разных этапах пассирования при пониженной температуре / Т.Е. Медведева, Р.П. Шапошникова, Л.И. Коляк и др. - Ленинград, 1977. - 19. - С. 128-136.
77. Медведева Т.Е. Разработка живой интраназальной аллантоисной гриппозной вакцины из рекомбинантных штаммов вируса гриппа / Т.Е. Медведева // *Заключительный отчет отдела вирусологии НИИЭМ за 1980 год*. -1980.
78. Медведева, Т.Е. Анализ температурочувствительных мутаций в геноме эпидемических штаммов вируса гриппа А / Т.Е. Медведева, Н.А. Иванова // *Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций* - Л., 1986. - 34-43 с.
79. Медуницин, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницин. - М.: Триада-Х, 2004. - 448 с.
80. Методические рекомендации «Доклинические испытания эффективности и безопасности новых иммунобиологических лекарственных препаратов». - Москва, 2010 - 39 с.

81. Найхин, А.Н. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) - А(H1N1)pdm2009 / А.Н. Найхин, С.А. Доница, Г.Д. Петухова и др. // *Вопр. вирусол.* - 2013. - 58 (2). - С. 38-42.
82. Наследов, А.Д. SPSS 15: Профессиональный статистический анализ данных / А.Д. Наследов. - Санкт-Петербург: Питер, 2011. - 416 с.
83. Научно-исследовательский институт гриппа. Ситуация по гриппу в России и мире [Электронный ресурс]. - 2010. - Режим доступа: http://www.influenza.spb.ru/system/epidemiological_situation/situation_on_a_flu/.
84. Патент 2110277 РФ, МПК А61К С12N. Штамм А/17/Иоганнесбург/94/1 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых [Текст] / Ю.Р. Романова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №96110707; заявл. 30.05.1996; опубл. 10.05.1998. Бюл. №13.
85. Патент 2128223 РФ, МПК А61К С12N. Штамм А/17/Нанчанг/95/4(H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых [Текст] / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107558; заявл. 07.05.1997; опубл.27.03.1999.
86. Патент 2127757 РФ, МПК А61К С12N.Штамм А/47/Нанчанг/95/13 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, И.В. Киселева; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107583; заявл. 07.05.1997; опубл. 20.03.1999.
87. Патент 2128224 РФ, МПК А61К С12N. Штамм В/60/Петербург/95/20 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107583; заявл. 07.05.1997; опубл. 20.03.1999.
88. Патент 2215786 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Иоханнесбург/99/50 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Ю.А. Дешева, Н.В. Ларионова, А.И. Климов; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2002107089; заявл. 19.03.2002; опубл. 10.11.2003, Бюл. № 31.
89. Патент 2285723 РФ, МПК А61К С12N С12R. Штамм вируса гриппа А/17/Вайоминг/03/8 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2004137762/13; заявл. 23.12.2004; опубл. 20.10.2006, Бюл. № 29.

90. Патент 2307161 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Джилин/03/1 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова, Н.В. Ларионова, А.Н. Климов; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». -№ 2005134836; заявл. 09.11.2005; опубл. 27.09.2007, Бюл. № 27.
91. Патент 2416639 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Малайзия/04/898 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - № 2009149606; заявл. 30.12.2009; опубл.20.04.2011, Бюл. № 11.
92. Патент 2422519 РФ, МПК А61К С12N.Штамм вируса гриппа В/60/Флорида/04/181 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». - №2010100711; заявл. 11.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
93. Патент 2422518 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа для А/17/Соломоновы острова/06/9 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2010100709; заявл. 11.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
94. Патент 2285723 РФ, МПК А61К С12N.Штамм вируса гриппа для А/17/Брисбен/07/28 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2010100523; заявл. 11.01.2010; опубл. 20.04.2011, Бюл. № 11.
95. Патент 2285723 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа для А/17/Брисбен/07/1 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». -№ 2010100524/10; заявл. 11.01.2010; опубл. 20.04.2011, Бюл. № 11.
96. 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.
97. Патент 2413765 РФ, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной

- вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2009134769; заявл.16.09.2009; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 7.
98. Патент 2545695 РФ, МПКА61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Висконсин/2010/125 [Текст] / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.А. Дубровина, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2012130552/10; заявл.17.07.2012; опубл. 27.01.2014, Бюл. № 3.
99. Патент 2532844 РФ, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Виктория/2011/89 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2012130551/10; заявл. 17.07.2012; опубл. 10.11.2014, Бюл. № 31.
100. Патент 2545706 РФ, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа А/17/Индиана/11/72(H3N2)v для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Е.А. Баженова, И.В. Киселева, В.А. Кузнецова, И.А. Дубровина, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2013149106/10; заявл. 05.11.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
101. Патент 2563352 РФ, МПКС12N 7/00, А61К 39/145, А61Р 31/16. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Техас/2012/30 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Дубровина И.А., Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». -№2013149196; заявл. 5.11.2013; опубл.20.09.2015, Бюл. № 26.
102. Патент 2546190РФ, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Массачусетс/2012/10 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Дубровина И.А., Киселева И.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2013149470/10; заявл. 06.11.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
103. План мероприятий на 2009 год по предупреждению распространения в Российской Федерации заболеваний, вызванных высокопатогенным вирусом гриппа. Утвержден распоряжением Правительства Российской Федерации от 5 августа 2009 г., № 1098.
104. Полежаев, Ф.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975-1976 гг. / Ф.И. Полежаев, Г.И. Александрова // Вопр. вирусол. - 1979. - 4. - С. 430.
105. Полежаев, Ф.И. Живая рекомбинантная вакцина против гриппа : автореф. дис. ... д-ра. мед. наук: 03.00.06 / Полежаев Фиал Ибрагимович - Л., 1983.

106. Полежаев, Ф.И. Безвредность и высокая иммуногенность для детей 3-15 лет моно и дивакцины из рекомбинантных вирусов гриппа А/Бразилия/11/87/(H1N1) и А/Бангкок/1/79(H3N2), полученных на основе вируса А/Ленинград/134/47/57(H2N2) / Полежаев Ф.И., Будиловский Г.Н., Гармашова Л.М. и др. // Вопр. вирусол. - 1984. - 6. - С. 710-714.
107. Полежаев, Ф.И. Роль температурочувствительных мутантов в естественной эволюции вируса гриппа / Ф.И. Полежаев, А.А. Смородинцев // Вопр. вирусол. - 1986. - 2. - С. 148-152.
108. Полежаев, Ф.И. Аттenuированные рекомбинанты вируса гриппа В / Ф.И. Полежаев, А.А. Гаврилов, Г.Н. Будиловский др. // Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций. Л., - 1986. - С. 109-116.
109. Подчерняева, Р.Я. Получение рекомбинанта, антигенно идентичного циркулирующему в природе штамму, при скрещивании вируса гриппа человека с вирусом гриппа птиц / Р.Я. Подчерняева, Д.К. Львов, Е. Килбурн и др. // Молекулярная биология. - Л., 1979.-С.59-63.
110. Подчерняева, Р.Я. Генетика и эволюция вирусов гриппа / Р.Я. Подчерняева, Е.С. Исаева, И.А. Мясникова, К.С. Куликова. - М.: Медицина, 1981. - 215 с.
111. Подчерняева, Р.Я. Изучение генетических признаков и генного состава у рекомбинантов вирусов гриппа / Р.Я. Подчерняева, В.К. Блинова, Н.Н. Соколова и др. // Молекулярная биология вируса гриппа и гепатита. - М., 1982. - 57 с.
112. Попова, А.Ю. Влияние ежегодной иммунизации населения против гриппа на заболеваемость этой инфекцией в Российской Федерации / Попова А.Ю., Е.Б. Ежлова, А.А. Мельникова и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2016. - 15 (1 (86)). - С. 48-55.
113. Правила лабораторной практики. Приказ Минздрава РФ №708н от 23.08.2010. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.rg.ru/2010/10/22/laboratornaya-praktika-dok.html>.
114. Приказ № 150/40 Министерства Здравоохранения СССР от 11.04.1990 «О подготовке новых вакцинных производственных и диагностических штаммов вируса гриппа и их внедрении в производство вакцинных и диагностических препаратов». - 1990.
115. Приказ № 156/29 МЗ РФ от 07.05.1998 «О подготовке новых вакцинных производственных и диагностических штаммов вируса гриппа и их внедрении в производство вакцинных и диагностических препаратов» -1998. - 14 с.
116. Приказ № 108/887 департамента здравоохранения и Управления Роспотребнадзора от 15.12.2009 г.
117. Роспотребнадзор СарИнформ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.sarinform.ru/news/2012/10/06/87273>.

118. Руденко, Л.Г. Пути повышения эффективности вакцинопрофилактики в СССР: Автореф.дисс. ... д-ра мед. наук: 03.02.06 / Руденко Лариса Георгиевна - Л., 1984. - 20 с.
119. Руденко, Л.Г. Итоги изучения живой гриппозной интраназальной вакцины при иммунизации детей 3-15 лет / Л.Г.Руденко, Е.П. Григорьева, В.П. Дриневский и др. // ЖМЭИ. - 1988. - 5. - С. 41-46.
120. Руденко, Л.Г. Основные характеристики живой гриппозной вакцины для детей из штаммов вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) при отдельном и совместном применении / Л.Г. Руденко, Я.С. Шварцман, Л.В. Исполатова и др. // Вопр. вирусол. - 1989. - 1. - С. 29-34.
121. Руденко, Л.Г. Прививочные свойства живой гриппозной рекомбинантной вакцины типов А и В при отдельном и совместном применении детям 3-14 лет / Л.Г. Руденко, А. Рамирес, М. Барро и др. // Вопр. вирусол. - 1991. - 36 (6). - С. 472-475. Руденко, Л.Г. Сравнительная оценка безвредности, иммуногенной активности и профилактической эффективности взрослого и детского вариантов живой гриппозной вакцины у школьников 7-14 лет при стандартных схемах введения / Л.Г. Руденко, Я.С. Шварцман, А.В. Исполатова и др. // Вопр. вирусол. - 2002. - 4. - С. 24-27.
122. Руденко, Л.Г. Разработка и клиническое изучение отечественной живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа / Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак, А.Н. Найхин // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2013. - 4 (71). - С. 74-81.
123. Смородинцев, А.А. Роль вируса в этиологии эпидемического гриппа / А.А. Смородинцев // Военно-санитарное дело. - 1937. - 2. - С. 32.
124. Смородинцев, А.А. Грипп и его профилактика. Л.: Медицина, 1984. - 384 с.
125. Смородинцев, А.А. Изменения биологических свойств вирулентных для мышей штаммов вируса гриппа (H0N1) под воздействием гомологичных антител / А.А. Смородинцев, Н.А. Иванова, Т.Е. Медведева и др. // Вопр. вирусол. - 1984. - 6. - С. 663-667.
126. Факторы неспецифической резистентности при вирусной инфекции / ред. Р.Я. Поляк и Т.Я. Лузянина - Ленинград: АМН СССР, 1980. - С.64-76.
127. Фармакопейная статья (ФСП: Р N003224/01-270313) на Ультравак[®], вакцину гриппозную аллантоисную живую для интраназального применения для взрослых и для детей.
128. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев - М.- 2005. - 832 с.

129. Цфасман, Т.М. Молекулярные механизмы холодаадаптации и реверсий к ts⁺ фенотипу вирусов гриппа А и В: дис.... канд. биол. наук: 03.02.02 / Цфасман Татьяна Михайловна - М., 2010. - 147 с.
130. 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 // Вопр. вирусол. - 2012. - 6 (57). - С. 13-17.
131. Adeola, O.A. Detection of pandemic strain of influenza virus (A/H1N1/pdm09) in pigs, West Africa: implications and considerations for prevention of future influenza pandemics at the source [Электронный ресурс] / O.A. Adeola, B.O. Olugasa, B.O. Emikpe // Infect Ecol Epidemiol. - 2015. - 5: 30227. - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v5.30227>.
132. Alexandrova, G.I. Basic trends in vaccination of children against influenza by use of live vaccine / G.I. Alexandrova // Proceedings of the Symposium on live influenza vaccine. - Zagreb: Copyright by the Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1971. - P. 121-127.
133. Alexandrova, G.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: reactogenicity and antigenic activity of cold adapted recombinants and analysis of isolates from vaccines / G.I. Alexandrova, F.I. Polezhaev, G.N. Budilovsky et al // Infect. Immun. - 1984. - 44 (3). - P. 734-739.
134. 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. Maassab, K. Maassab // Vaccine. - 1990. - 8 (1). - P. 61-64.
135. Alexandrova, G.I. Live influenza vaccine in Russia // In Brown L.E., Hampson A.W., Webster R.G. (ed.), Proceedings of "Options for the Control of Influenza III". Cairns, Australia, 4-9 May 1996. ICS 1123. Amsterdam: Elsevier. 1996. - P. 123-128.
136. Ambrose, C.S. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. Influenza / C.S. Ambrose, C. Luke, K. Coelingh // Resp Virus. - 2008. - 2 (6). - P. 193-202.
137. Ananthanarayan, R. Non-specific inhibitors of influenza viruses in normal sera / R. Ananthanarayan, C.K.J.A. Paniker // Bull.WHO. - 1960. - 22. - P. 409-419.
138. Anders, E.M. Complement-dependent neutralization of influenza virus by a serum mannose-binding lectin / E.M. Anders, C.A. Hartley, P.C. Reading, R.A. Ezekowitz // J Gen Virol. - 1994. - 75 (Pt 3). - P. 615-622.
139. Arruda, E. Respiratory Tract Viral Infections / E. Arruda, O.A.L. Cintra, F.G. Hayden // In: Tropical infectious Diseases. - Eds: R.L. Guerrant, D.H. Walker, and P.F. Weller. - Principles,

- Pathogens & Practice. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Churchill Livingstone, 2006. - P. 637-679.
140. Baigent, S.J. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission / S.J. Baigent, J.W. McCauley // *Bioessays*. -2003. - 25 (7). - P. 657-671.
 141. Bean, W.J. Recombination of human influenza A viruses in nature / W.J. Bean, N.J. Cox, A.P. 4// *Nature*. - 1980. - 284. - P. 638-640.
 142. Bedford, T. Strength and tempo of selection revealed in viral gene genealogies [Электронный ресурс] / T. Bedford, S. Cobey, M. Pascual // *BMC Evol. Biol.* - 2011. - 11. - Режим доступа: DOI: 10.1186/1471-2148-11-220
 143. Bedford, T. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift / T. Bedford, S. Riley, I.G. Barr et al. // *Nature*. - 2015. - 523 (7559). - P. 217-220.
 144. Belshaw, R. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses / R. Belshaw, A. Gardner, A. Rambaut, O.G. Pybus, // *Trends Ecol Evol.* - 2008. - 23 (4). - P. 188-193.
 145. Belshe, R. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine / R. Belshe, M.S. Lee, R.E. Walker et al. // *Expert Rev Vaccines*. - 2004. - 3 (6) - P. 643-654.
 146. Belshe, R.B. The origins of pandemic influenza - lessons from the 1918 virus / R.B. Belshe // *N Engl J Med*. -2005. - 353 (21). - P. 2209-2211.
 147. Bi, Y. Two novel reassortants of avian influenza A (H5N6) virus in China / Y. Bi, K. Mei, W. Shi et al. // *J. Gen. Virol.* - 2015. - 96 (5). - P. 975-981.
 148. Bier, K. Cellular cap-binding proteins associate with influenza virus mRNAs / K. Bier, A. York, E. Fodor // *J Gen Virol.* - 2011. - 92 (7). -P. 1627-1634.
 149. Block, S.L. Shedding and immunogenicity of live attenuated influenza vaccine virus in subjects 5-49 years of age / S.L. Block, R. Yogev, F.G. Hayden et al. // *Vaccine*. - 2008. - 26 (38). - P. 4940-4946.
 150. Bouvier, N.M. The biology of influenza viruses / N.M. Bouvier, P. Palese // *Vaccine*. - 2008. - 26 (Suppl. 4). - P. D49-D53.
 151. Böttcher, E. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium / E. Böttcher, T. Matrosovich, M. Beyerle et al. // *J Virol.* - 2006. - 80 (19). P. 9896-8.
 152. Böttcher-Friebertshäuser, E. The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity / E. Böttcher-Friebertshäuser, W. Garten, M. Matrosovich, H.D. Klenk // *Curr Top Microbiol Immunol.* - 2014. - 385. - P. 3-34.

153. Braam, J. Molecular model of a eukaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription / J. Braam, I. Ulmanen, R.M. Krug // *Cell*. -1983. - 34 (2). - P. 609-618.
154. Brand, C. Sequential passage of influenza virus in embryonated eggs or tissue culture: emergence of mutants / C. Brand, P. Palese // *Virology*. - 1980. - 107 (2). - P. 424-433.
155. Brown, I.H. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2 / I.H. Brown, P.A. Harris, D.J. // *Alexander Epidemiol Infect*. - 1995. - 114 (3). - P. 511-520.
156. Buonagurio, D.A. Noncumulative sequence changes in the hemagglutinin genes of influenza C virus isolates / D.A. Buonagurio, S. Nakada, U. Desselberger et al. // *Virology*. - 1985. - 146 (2). - P. 221-32.
157. Bushnell, R.V. Serological characterization of guinea pigs infected with H3N2 human influenza or immunized with hemagglutinin protein / R.V. Bushnell, J.K. Tobin, J. Long et al. // *Virology*. - 2010. - 7 (200). - P. 1-11.
158. Capua, I. Review article. Avian influenza and human health / I. Capua, D.J. Alexander // *Acta Tropica*. - 2002. - 83(1). - P.1-6.
159. Carter, N.J. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™). A review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults / N.J. Carter, M.P. Curran // *Drugs*. - 2011. - 71 (12). - P. 1591-1622.
160. Caton, A.J. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype) / A.J. Caton, G.G. Brownlee, J.W. Yewdell, W. Gerhard // *Cell*. - 1982. - 31 (2 Pt 1). - P. 417-427.
161. Cate, T.R. Clinical manifestations and consequences of influenza / T.R. Cate // *Am J Med*. - 1987. - 82 (6A). - P. 15-19.
162. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity - United States and worldwide, 1995-96 season, and composition of the 1996-97 influenza vaccine [Электронный ресурс] / *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. - 1996. - 45 (16). - P. 326-329. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00040980.htm>
163. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reported infections with variant influenza viruses in the United States since 2005. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/variant-cases-us.htm>.
164. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity - United States, September 28, 2008-April 4, 2009, and composition of the 2009-10 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. - 2009. - 58 (14). - P. 369-374.
165. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of Rapid Influenza Diagnostic Tests for Influenza A (H3N2)v Virus and Updated Case Count [Электронный ресурс]. /

- United States, MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2012. - 61 (32). - P. 619-621. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6132a4.htm>.
166. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Influenza A (H3N2) variant virus. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-cases.htm>.
167. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Types of influenza viruses. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
168. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Examples of human infections with avian influenza viruses. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-human-infections.htm>.
169. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). First Global Estimates of 2009 H1N1 Pandemic Mortality Released by CDC-Led Collaboration [Электронный ресурс]. 25 June 2012 / Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm>.
170. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Highly pathogenic asian avian influenza A (H5N1) in people. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-people.htm>.
171. Center for Immunization and Respiratory Diseases. Influenza Activity — United States [Электронный ресурс] / Center for Immunization and Respiratory Diseases. - 2014. - Режим доступа: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6408a2.htm>.
172. Chambers, T.M. Equine/canine/feline/seal influenza / T.M. Chambers, E.J. Dubovi, R.O. Donis et al. // P. 203-217. In: Textbook of influenza. - Ed.: R.G. Webster, A.S. Monto, T.J. Braciale, R.A. Lamb. - UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
173. Chanturiya, A.N. PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes / A.N. Chanturiya, G. Basanez, U. Schubert et al. // J Virol. - 2004. - 78 (12). - P. 6304-6312.
174. Chen, B.J. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly / B.J. Chen, M. Takeda, R.A. Lamb // J Virol. - 2005. - 79 (21). - P. 13673-13684.
175. Chen, H. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study / H. Chen, H. Yuan, R. Gao et al. // Lancet. - 2014. - 383 (9918). - P.714-721.
176. Chen, G.W. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses / G.W. Chen, S.C. Chang, C.K. Mok et al. // Emerg Infect Dis. - 2006. - 12 (9). - P. 1353-60.
177. Chen, G.W. Is avian influenza A (H7N9) virus staggering its way to humans? / G.W. Chen, M.M. Lai, S.C. Wu et al. // J Formos Med Assoc. - 2013. - 112 (6). - P. 312-318.

178. Chen, G-W. Genomic signatures for avian H7N9 viruses adapting to humans [Электронный ресурс] / G-W. Chen, S-M. Kuo, S-L. Yang et al. // PLoS One. - 2016. - 11(2). Режим доступа: doi: 10.1371/journal.pone.0148432.
179. Chen, J.M. Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus / J.M. Chen, Y.J. Guo, K.Y. Wu et al. // Arch. Virol. - 2007. - 152 (2). - P. 415-422.
180. Chen, L.M. In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity / L.M. Chen, O. Blixt, J. Stevens et al. // Virology. - 2012. - 422 (1). - P.105-113.
181. Chen, R. The evolutionary dynamics of human influenza B virus / R. Chen, E.C.Holmes // J Mol Evol. - 2008. - 66 (6). - P. 655-663.
182. Chen, W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen, P.A. Calvo, D. Malide, et al. // Nat Med. - 2001. - 7 (12). - P. 1306-1312.
183. 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. - 345 (2). - P. 416-423.
184. 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. Jun // Virology. - 2008. - 380 (2). - P. 354-362.
185. Chi, C.Y. Clinical features of children infected with different strains of influenza B in southern Taiwan / C.Y. Chi, S.M. Wang, C.C. Lin et al. // Pediatr Infect Dis J. - 2008. - 27 (7). - P. 640- 645.
186. Chiapponi, C. Detection of influenza D virus among swine and cattle, Italy [letter] [Электронный ресурс] / C. Chiapponi, S. Faccini, A. de Mattia et al. // CDC. Emerg Infect Dis. - 2016. Режим доступа: DOI: 10.3201/eid2202.151439.
187. Choppin, P.V. Two kinds of particles with contrasting properties in influenza A virus strains from the 1957 pandemic / P.V. Choppin, I. Tamm // Virology.- 1959.- 8.- P.539-542.
188. Chu, C.M. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature / C.M. Chu, S.F. Tian, G.F. Ren et al. // J Virol. 1982. -41 (2). -P. 353–359.
189. Chutinimitkul, S. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding / S. Chutinimitkul, S. Herfst , J. Steel et al. // J Virol. - 2010. - 84(22). -P.11802-11813.
190. Claas, E.C. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus / E.C. Claas, A.D. Osterhaus, R.van Beek et al. // Lancet . - 1998. - 351 (9101). - P.472-477.

191. Coelingh, K.L. Development of live attenuated influenza vaccines against pandemic influenza strains / K.L. Coelingh, C.J. Luke, H. Jin, K.R. Talaat // *Expert Rev. Vaccines*. - 2014. - 13 (7). - P. 855-871.
192. Compans, R.W. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus / R.W. Compans, J. Content, P.H. Duesberg // *J Virol*. - 1972. - 10 (4). - P. 795-800.
193. Conenello, G.M. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo / G.M. Conenello., J.R. Tisoncik, E. Rosenzweig et al. // *J Virol*. - 2011. - 85 (2). - P. 652-662.
194. Connor, R.J. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. / R.J. Connor, Y. Kawaoka, R.G. Webster, J.C. Paulson // *Virology*. - 1994. - 205 (1). - P.17-23.
195. Couceiro, J.N. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity / J.N. Couceiro, J.C. Paulson, L.G. Baum // *Virus Res*. - 1993. - 29 (2). - P. 155-165.
196. Cox, N.J. Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature-sensitive) influenza viruses: nonrandom reassortment of genes during preparation of live virus vaccine candidates by recombination at 25 degrees between recent H3N2 and H1N1 epidemic strains and cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / N.J. Cox, H. F. Maassab, A.P. Kendal // *Virology*. - 1979. - 97 (1). - P. 190-194.
197. Cox, N.J. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) / N.J. Cox, F. Kitame, A.P. Kendal et al. // *Virology*. - 1988. - 167 (2). - P. 554- 567.
198. Crawford, P.C. Transmission of equine influenza virus to dogs / P.C. Crawford, E.J. Dubovi, W.L. Castleman et al. // *Science*. - 2005. - 310 (5747). - P. 482-485.
199. Cros, J.F. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses / J.F. Cros, P. Palese // *Virus Res*. - 2003. - 95 (1-2). - P. 3-12.
200. Dalton, R.M. Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes / R.M. Dalton, A.E. Mullin, M.J. Amorim et al. // *Virology J*. - 2006. - 3 (58). - P. 1-16.
201. Daum, L.T. Genetic and antigenic analysis of the first A/New Caledonia/20/99-like H1N1 influenza isolates reported in the Americas / L.T. Daum , L.C. Canas, C.B. Smith et al. // *Emerg Infect Dis*. - 2002. - 8 (4). - P. 408-412.

202. Davies, H.W. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses / H.W. Davies, G. Appleyard, P. Cunningham, M.S. Pereira // Bull. WHO. - 1978. - 56 (6). - P. 991-993.
203. Dawood, F.S. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans / F.S. Dawood, S. Jain, L. Finelli et al. // N Engl J Med. -2009. - 360 (25). - P. 2605-2615.
204. Dawood, F.S. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study / F.S. Dawood, A.D. Iuliano, C. Reed et al. // Lancet Infect Dis. - 2012. - 12 (9). - P. 687-695.
205. DeBorde, D.C. Sequence comparison of wild-type and cold-adapted B/Ann Arbor/1/66 influenza virus genes / D.C. DeBorde, A.M. Donabedian, M.L. Herlocher et al. // Virology. - 1988. - 163 (2). - P. 429-443.
206. De Jong, M.D. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia / M.D. de Jong, C.P. Simmons, T.T. Thanh et al. // Nat Med. - 2006. - 12 (10). - P. 1203-1207.
207. Development of a clinical trial plan for pandemic influenza vaccines [Электронный ресурс] / Meeting Summary // Department of Health and Human Services National Institutes of Health National Institute of Allergy and Infectious Diseases- September 22-23, 2003 Bethesda, Maryland". Режим доступа: <https://www.niaid.nih.gov/about/organization/dmid/Documents/pansummary.pdf>.
208. Davies, H.W. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses / H.W. Davies, G. Appleyard, P. Cunningham, M.S. Pereira // Bull. WHO.-1978.-56. -P. 991–993.
209. Di Lella, S. Modulation of the pH stability of influenza virus hemagglutinin: a host cell adaptation strategy / S. Di Lella, A. Herrmann, C.M. Mair // Biophysical J. - 2016. - 110(11). - P.2293-2301.
210. Donabedian, A.M. Genetics of cold-adapted B/Ann Arbor/1 /66 influenza virus reassortants: the acidic polymerase (PA) protein gene confers temperature sensitivity and attenuated virulence / A.M. Donabedian, D.C. DeBorde, F. H. Maassab // Microbial Pathogenesis. -1987. - 3 (2). - P. 97-108.
211. Donabedian, A.M. A mutation in the PA protein gene of cold-adapted B/Ann Arbor/1/66 influenza virus associated with reversion of temperature sensitivity and attenuated virulence / A. M. Donabedian, D. C. DeBorde, S. Cook et al. // Virology. - 1988. - 163 (2). - P. 444-451.
212. Ducatez, M.F. Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria / M.F. Ducatez, C.M. Olinger , A.A. Owoade et al. // Nature. - 2006. - 442 (7098). - P. 37.

213. Dudas, G. Reassortment between influenza B lineages and the emergence of a coadapted PB1-PB2-HA gene complex / G. Dudas, T. Bedford, S. Lycett, A. Rambaut // *Mol. Biol. Evol.* - 2014. - 32 (1). - P. 162-172.
214. ECDC scientific advice on seasonal influenza vaccination of children and pregnant women: Technical report [Электронный ресурс] / European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm: ECDC. 2012:68. - Режим доступа: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Seasonal%20influenza%20vaccination%20of%20children%20and%20pregnant%20women.pdf>.
215. ECDC. Influenza in Europe. Season 2015-2016. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/PublishingImages/influenza-end-of-season-2015-16.jpg.
216. ECDC. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) in Europe [Электронный ресурс] / Rapid risk assessment. Updated 18 November 2016. - Режим доступа: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/risk-assessment-avian-influenza-H5N8-europe.pdf>.
217. Englund, L. Studies on influenza viruses H10N4 and H10N7 of avian origin in mink / L. Englund // *Vet Microbiol.* - 2000. - 74 (1-2). - P. 101-107.
218. Fauci, A.S. Race against time / A.S. Fauci // *Nature.* - 2005. - 435 (7041). - P. 423-424.
219. Ferguson, N.M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution / N.M. Ferguson, A.P. Galvani, R.M. Bush // *Nature.* - 2003. - 422 (6930). P. 428-433.
220. Fiore, A.E. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010 / Fiore A.E., Uyeki T.M., Broder K., et al. // *MMWR Recomm Rep.* - 2010. - 59 (RR-8). - P. 1-62.
221. FluNet. Global Influenza Programme [Электронный ресурс] / Geneva, World Health Organization, 2003. - Режим доступа: <http://www.who.int/influenza/en/>.
222. Forbes, N. Identification of Adaptive Mutations in the Influenza A Virus Non-Structural 1 Gene That Increase Cytoplasmic Localization and Differentially Regulate Host Gene Expression / N. Forbes, M. Selman, M. Pelchat, et al. // *Plos One.* - 2013. - 8(12). -P. 1-17.
223. Fouchier, R.A. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome / R.A. Fouchier, P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2004. - 101 (5). - P. 1356-1361.
224. Fouchier, R.A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A. Fouchier, V. Munster, A. Wallensten et al. // *J Virol.* - 2005. - 79 (5). - P. 2814-2822.

225. Frost, W.H. Statistics on influenza morbidity: with special reference to certain factors in case incidence and case fatality / W.H. Frost // *Public Health Rep.* - 1920. - 35 (11). - P.584-597.
226. Fujii, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions / Y. Fujii, H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, Y. Kawaoka // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2003. - 100 (4). - P. 2002-2007.
227. Gabriel, G. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus [Электронный ресурс] / G. Gabriel, A. Herwig, H.D. Klenk // *PLoS. Pathog* - 2008. - 4 (2). - Режим доступа: 10.1371/journal.ppat.0040011.
228. Gallagher, P.J. Glycosylation requirements for intracellular transport and function of the hemagglutinin of influenza virus / P.J. Gallagher, J.M. Henneberry, J.F. Sambrook, M J. Gething // *J Virol.* - 1992. - 66 (12). - P. 7136-7145.
229. Gambaryan, A.S. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine / A.S. Gambaryan, A.B. Tuzikov, V.E. Piskarev et al. // *Virology* 1997. - 232 (2). - P. 345-350.
230. Gambaryan, A.S. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses / A.S. Gambaryan, J.S. Robertson, M.N. Matrosovich // *Virology.* - 1999. - 258 (2). - P. 232-239.
231. Gambaryan, A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses / A. Gambaryan, A. Tuzikov, G. Pazynina et al. // *Virology.* - 2006. - 344(2). - P. 432-438.
232. Gamblin, S.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins / S.J. Gamblin, J.J. Skehel // *J. Biol. Chemistry.* - 2010. - 285 (37). - P. 28403-28409.
233. Gambotto, A. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus / A.Gambotto, S.M. Barratt-Boyes, M.D. de Jong et al. // *Lancet.* - 2008. - 371 (9622). - P. 1464-1475.
234. Gammelin, M. Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor / M. Gammelin, A. Altmuller, U. Reinhardt et al. // *Mol Biol Evol.* - 1990. - 7 (2). - P. 194-200.
235. Gao, R. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus / R. Gao, B. Cao, Y. Hu et al. // *N Engl J Med .* - 2013. - 368 (20). - P.1888-1897.
236. Gao, Q. Rewiring the RNAs of influenza virus to prevent reassortment/ Q. Gao, P. Palese // *Proc Natl Acad Sci.* - 2009. - 106 (37). - P. 15891-15896.
237. Garten, W. Understanding influenza virus pathogenicity / W. Garten , H.D. Klenk // *Trends Microbiol.* - 1999. - 7 (3). - P. 99-100.

238. Garten, R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R.J. Garten, C.T. Davis, C.A. Russell et al. // *Science*. - 2009. - 325 (5937). - P. 197-201.
239. Geiss, G.K. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza / G.K. Geiss, M. Salvatore, T.M. Tumpey et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2002. - 99 (16). - P. 10736-10741.
240. Geraci, J.R. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus / J.R. Geraci, D.J. Aubin, I.K. Barker et al. // *Science*. - 1982. - 215 (4536). - P. 1129-1131.
241. Ghedin, E. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution / E. Ghedin, N. Sengamalay, A. Shumway et al. // *Nature*. - 2005. - 437 (7062). - P. 1162-1166.
242. Giesendorf, B. Temperature sensitivity in maturation of mammalian influenza A viruses / B. Giesendorf, F.X. Bosch, K. Wahn, R. Rott // *Virus Res*. - 1984. - 1(8). - P. 655-667.
243. Giles, B.M. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets / B.M. Giles, T.M. Ross // *Vaccine*. - 2011. - 29 (16). - P. 3043-3054.
244. Glaser, L.A. Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity / L. Glaser, J. Stevens, D. Zamarin et al. // *J Virol*. - 2005. - 79 (17). - P. 11533-11536.
245. Gimsa, U. Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity / U. Gimsa, I. Grotzinger, J. Gimsa // *Virus Res*. - 1996. - 42(1-2). - P. 127-135.
246. Glezen, P.W. The burden of influenza B: a structured literature review [Электронный ресурс] / P.W. Glezen, J. K. Schmier, C. M. Kuehn et al. // *Am J Public Health*. - 2013. - 103 (3). - Режим доступа: P. e43-e51.
247. Gong, L. Stability-mediated epistasis constrains the evolution of an influenza protein [Электронный ресурс] / L.Gong, M.A. Suchard, J.D. Bloom // *eLife*. - 2013. - P. 1-19. - Режим доступа: doi: 10.7554/eLife.00631.
248. Gorodkova (Larionova), N. Genome analysis of influenza A virus strains isolated during an epidemic of 1979-1980 / Y. Ghendon, A. Klimov, N. Gorodkova (Larionova), L. Dohner // *J Gen Virol*. - 1981. - 56 (Pt.2). - P. 303-313.
249. Gorodkova (Larionova), N. Genome analysis of epidemic influenza A virus strains isolated in 1979-1983 / A. Klimov, A. Tichonova, N. Gorodkova (Larionova), L. Dohner // *Acta Virol*. - 1984. - 28 (6). - P. 479-486.

250. Gottschalk, A. Glycoproteins as influenza virus hemagglutinin inhibitors and as cellular virus receptors / A. Gottschalk, G. Belyavin, F. Biddle // In: Gottschalk A., editor. Glycoproteins. Their composition, structure and function, part A. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publishing Co.; 1972. P. 1082-1096.
251. Grant, E. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD⁸⁺ T-cell responses / E. Grant, C. Wu, K.F. Chan et al. // Immunol Cell Biol. - 2013. - 91 (2). - P. 184-194.
252. Gu, J. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study / J. Gu, Z. Xie, Z. Gao et al. // Lancet. - 2007. - 370(9593). - P.1137-1145.
253. Guan, Y. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR / Y. Guan, J.S. Peiris, A.S. Lipatov et al. // Proc Natl Acad Sci USA. - 2002. - 99 (13). - P.8950-8955.
254. Gulati, S. Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread [Электронный ресурс] / S. Gulati, D.F. Smith, R.D. Cummings et al. // PLoS One. -2013. -8 (6). - Режим доступа: doi: 10.1371/journal.pone.0066325.
255. Guo, Y.J. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus / Guo Y.J., G.J. Feng, W. Ping et al. // J Gen Virol. - 1983. - 64 (Pt.1). - P. 177-182.
256. Guo, Y.J. Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China / Y. J. Guo, X. Xu, N.J. Cox // J Gen Virol. 1992. - 73 (Pt.2). - P. 383-388.
257. Gustin, K. Comparative immunogenicity and cross-clade protective efficacy of mammalian cell-grown inactivated and live-attenuated H5N1 reassortant vaccines in ferrets / K. Gustin, T. Maines, J. Belser // J Infect Dis. - 2011. - 204 (10). - P. 1491-1499.
258. Hale, B.G. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses / B.G. Hale, R.E. Randall, J. Ortín, D. Jackson // J Gen Virol. - 2008. - 89 (10). - P. 2359-2376.
259. Hampson, A.W. Influenza virus antigens and “antigenic drift” / A.W. Hampson // P.49-86. In: Influenza. - Ed.: C. W. Potter. - The Netherlands: Elsevier Science B.V., 2002. - 237 p.
260. Hampson, A.W. The influenza viruses / A.W. Hampson, J.S. Mackenzie // Medical Journal of Australia. - 2006. - 185 (10 Suppl). - P. S39-43.
261. Hancock, K. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus / K. Hancock, V. Veguilla, X. Lu, et al. // N Engl J Med. - 2009. - 361 (20). - P. 1945-1952.
262. Hanson, A. Identification of stabilizing mutations in an H5 hemagglutinin influenza virus protein / A. Hanson, M. Imai, M. Hatta et al. // J Virol. - 2016. - 90 (6). - P. 2981-2992.

263. Hatta, M. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses / M. Hatta, P. Gao, P. Halfmann, Y. Kawaoka // *Science*. - 2001. - 293 (5536). - P. 1840-1842.
264. Hatta, M. The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro / M. Hatta, Y. Kawaoka // *J Virol*. - 2003. - 77 (10). - P. 6050-6054.
265. Hause, B.M. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family / B.M. Hause, E.A. Collin, R. Liu et al. // *MBio*. 2014. - 5 (2). - P. 1-10.
266. Hay, A.J. The evolution of human influenza viruses / A.J. Hay, V. Gregory, A.R. Douglas, Y.P. Lin // *Phil Trans R Soc Lond*. - 2001. - 356 (1416). - P.1861-1870.
267. Health WOfA, Update on Highly Pathogenic Avian Influenza in Animals (TYPE H5 and H7) [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/2015>.
268. Heldens, J. Safety and immunogenicity in man of a cell culture derived trivalent live attenuated seasonal influenza vaccine: a phase I dose escalating study in healthy volunteers / J. Heldens, E. Hullskotte, T. Voeten et al. // *Vaccine*. - 2014. - 32 (39). - P. 5118-5124.
269. Henkel, M. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel / M. Henkel, D. Mitzer, P. Henklein et al. // *PLoS One*. - 2010. - 5 (6). - P. 1-11.
270. Herfst, S. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets / S. Herfst, E.J. Schrauwen, M. Linster et al. // *Science*. - 2012. - 336 (6088). - P.1534-1541.
271. Herfst, S. Avian influenza virus transmission to mammals / S. Herfst, M. Imai, Y. Kawaoka, R.A. Fouchier // *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014. - 385. - P. 137-155.
272. Herlocher, M.L. Molecular and biological changes in the cold-adapted "master strain" A/AA/6/60 (H2N2) influenza virus / M.L. Herlocher, H.F. Maassab, R.G. Webster // *Proc Natl Acad Sci USA*. -1993. - 90 (13). - P. 6032-6036.
273. Herlocher, M.L. Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations, which may contribute to attenuation / M.L. Herlocher, A. C. Clavo, H. F. Maassab // *Virus Res*. - 1996. - 42 (1-2). - P. 11-25.
274. Herrler, G. Sialic acid as receptor determinant of ortho- and paramyxoviruses / G. Herrler, J. Hausmann, H.D. Klenk, A. Rosenberg ed. // "Biology of the Sialic Acids". USA: Plenum Press, NY, 1995. - P. 315-336.
275. Hiromoto, Y. Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus / Y. Hiromoto, T. Saito, S.E. Lindstrom, Y. Li, R. Nerome, S. Sugita, M. Shinjoh, K. Nerome // *J Gen Virol*. - 2000. - 81 (Pt.4). - P. 929-937.
276. Hoffmann, E. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann, J. Stech, Y. Guan, R. Webster // *Arch Virol*. - 2001. - 146 (12). - P. 2275-2289.

277. Hoffmann, E. Rescue of influenza B virus from eight plasmids / E. Hoffmann, K. Mahmood, C. Yang // Proc Natl Acad Sci USA. - 2002. - 99 (17). - P. 11411-11416.
278. Hoffman, E. Multiple gene segment control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66 / E. Hoffman, K. Mahmood, Z. Chen et al. // J Virol.- 2005.- 79 (17).- P. 11014-11021.
279. Holland, J. Rapid evolution of RNA genomes / J. Holland, K. Spindler, E. Horodyski et al. // Science. - 1982. - 215 (4540). - P. 1577-1585.
280. Holmes, E.C. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: The comparative genomics of viral emergence / E.C. Holmes // Proc Natl Acad Sci USA. - 2010. - 107 (Suppl 1). - P.1742-1746.
281. Homma, M. Age distribution of the antibody to type C influenza virus / M. Homma, S. Ohyama, S. Katagiri // Microbiol Immunol. - 1982. - 26 (7). - P. 639-642.
282. Horimoto, T. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus / T. Horimoto, Y. Kawaoka // J Virol. - 1994. - 68 (5). - P. 3120-3128.
283. Hurt, A.C. Detection of evolutionarily distinct avian influenza A viruses in Antarctica / A.C. Hurt, D. Vijaykrishna, J. Butler, et al. // mBio. - 2014. - 5 (3). - P. 1-9.
284. Hutchinson, E.C. Genome packaging in influenza A virus / E.C. Hutchinson, J.C. von Kirchbach, J.R. Gog, P. Digard // J Gen Virol. - 2010. - 91 (2). - P. 313-328.
285. Imai, M. Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus / M. Imai, K. Kawasaki, T. Odagiri // J Virol. - 2008. - 82 (2). - P. 728-739.
286. Imai, M. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets / M. Imai, T. Watanabe, M. Hatta et al. // Nature. - 2012. - 486 (7403). - P. 420-428.
287. Influenza Virus Resource. NCBI. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>.
288. Intravenous Pathogenicity Index (IVPI). [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
289. 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. - 412 (2). - P. 297-305.
290. Isakova-Sivak, I. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers / I. Isakova-Sivak, M. Stukova, M. Erofeeva et al. // Hum Vaccin Immunother. 2015. - 11 (4). - P. 970-982.

291. Jackson, D. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity / D. Jackson, M.J. Hossain, D. Hickman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. - 2008. - 105. (11). - P. 4381-4386.
292. Jackson, D. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era / D. Jackson, R.A. Elderfield, W.S. Barclay // *J Gen Virol*. - 2011. - 92 (Pt.1). - P. 1- 17.
293. Jagger, B.W. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response / B.W. Jagger, H.M. Wise, J.C. Kash et al. // *Science*. - 2012. - 337 (6091). - P. 199-204.
294. Jiao, P. Pathogenicity, transmission and antigenic variation of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses [Электронный ресурс] / P. Jiao, H. Song, X. Liu et al. // *Front. Microbiol*. - 2016. - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00635>.
295. Jhung, M.A. Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds- United States, December 2014-January 2015 / M.A. Jhung, D.I. Nelson // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. - 2015. - 64. - P.111.
296. 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. Jin, B. Lu, H. Zhou et al. // *Virology*. - 2003. - 306 (1). - P. 18-24.
297. 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, G. Kemble // *J Virol*. - 2004. - 78 (2). - P. 995-998.
298. Jones, K.E. Global trends in emerging infectious diseases / K.E. Jones, N.G. Patel, M.A. Levy et al. // *Nature*. - 2008. - 451 (7181). - P. 990-993.
299. Jonson, P.R. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold adapted vaccine, and inactivated vaccine / P.R. Jonson, S. Feldman, J.M. Tomphson et al. // *J. Infect. Dis*. - 1986. - 154 (1). - P. 121-127.
300. Kanegae, Y. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season / Y. Kanegae, S. Sugita, A. Endo et al. // *J Virol*. - 1990. - 64 (6). - P. 2860-2865.
301. Karlsson, E. Evidence of influenza virus infection in nonhuman primates / E. Karlsson, G. Engel, M. Feeroz, at al. // *Emerg. Infect. Dis*- 2012. - 18 (10). - P. 1672-1675.
302. Katinger, H. Live vaccine and method of manufacture / H. Katinger, A. Egorov, B. Ferko et al. // *Patent*. - 2004. - US20040137013 A1.

303. Kash, J.C. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus / J.C. Kash, T.M. Tumpey, S.C. Proll et al. // *Nature*. - 2006. - 443 (7111). - P.578-581.
304. Kashiwagi, T. Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity [Электронный ресурс] / T. Kashiwagi, K. Hara, Y. Nakazono et al. // *PLoS ONE* 2010. - 5(12). Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0015140.
305. Kawaoka, Y. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells / Y. Kawaoka, R.G. Webster // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1988. - 85 (2). - P. 324-328.
306. Kawaoka, Y., Krauss S., Webster R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics / Y. Kawaoka, S. Krauss, R.G. Webster // *J Virol*. - 1989. - 63 (11). - P.4603-4608.
307. Keawcharoen, J. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards / J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, T. Kuiken et al. // *Emerg Infect Dis*. - 2004. - 10 (12). - P. 2189-2191.
308. Kemble, G. The molecular basis of the temperature sensitive (ts) and attenuation (att) phenotypes of FluMist™ vaccine strains / G. Kamble, J. Hong, E. Hoffmann et al. // *Influenza vaccines for the world. The 1-st international conference*. - Lisbon, Portugal, 24-26 May 2004. - P. 69.
309. Kendal, A.P. Identification and preliminary antigenic analysis of swine influenza-like viruses isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey / A.P. Kendal, M. Goldfield, G.R. Noble, W.R. Dowdle // *J Infect Dis*. - 1977. - 136(Suppl). -P. S381-385.
310. Kendal, A.P. Antigenic similarity of influenza A(H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950-1951 / A.P. Kendal, G.R. Noble, J.J. Skehel, W.R. Dowdle // *Virology*. - 1978. - 89 (2). - P. 632-636.
311. Kendal, A.P. Development of cold-adapted recombinant live, attenuated influenza A vaccines in the USA and USSR / A.P. Kendal, H.F. Maassab, G.I. Alexandrova, et al. // *Antiviral Res*. - 1982. - 1. - P. 339-365.
312. Kendal, A.P. Cold adapted live attenuated Influenza vaccines developed In Russia: can they contribute to meeting the needs for Influenza control in other countries? // *Eur J Epid*. - 1997. - 13 (5). - P. 591 - 609.
313. Khan, A.S. Comparison of US inactivated split-virus and Russian live attenuated, cold-adapted trivalent influenza vaccines in Russian schoolchildren / A.S. Khan, F.I. Polezhaev, R.I. Vasilijeva // *J Inf Dis*. - 1996. - 173 (2). - P. 453-456.

314. Khan, S.U. A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A(H9N2) infection among humans / S.U. Khan, B.D. Anderson, G.L. Heil et al. // *J Infect Dis* . - 2015. - 212 (4). - P.562-569.
315. Kilbourne, E.D. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants / E.D. Kilbourne // *Bull. World Health Organ.* - 1969. - 41 (3). - P. 643-645.
316. Kilbourne, E.D. Immunologic response to the influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin I. Studies in human vaccinees / E.D. Kilbourne, C.P. Cerini, M.W. Khan et al. // *J Immunol.* - 1987. - 138 (9). - P. 3010-3013.
317. Klimov, A.I. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus / A.I. Klimov, I.V. Kiseleva, G.I. Alexandrova, N.J. Cox // *International Congress Series.* -2001. -1219. -P. 955-959.
318. Klenk, H.D. The molecular biology of influenza virus pathogenicity / Klenk H.D., Rott R. // *Adv Virus Res.* - 1988. - 34. - P. 247-281.
319. Klimov, A. I. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus / A. I. Klimov, N. J. Cox, W.V. Yotov, E. Rocha, G. I. Alexandrova, A. P. Kendal // *Virology.* - 1992. - 186 (2). - P. 795-797.
320. Klimov, A.I. PCR restriction analysis of genome composition and stability of cold-adapted reassortant live influenza vaccines / A.I. Klimov, Cox. N.J. // *J Virol. Methods.* - 1995. - 52 (1-2). - P. 41-49.
321. Klimov, A.I. Genetic stability of Russian cold-adapted live attenuated reassortant influenza vaccines / A.I. Klimov, L.G. Rudenko, A.Y. Egorov et. al. // *Options for the control of influenza III. Proceedings of the third International Conference on Options for the Control of Influenza*, 4-9 May, 1996. - Cairns, Australia. - 1996. - P. 129-136.
322. Klimov, A. I. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus / A. I. Klimov, I. V. Kiseleva, G. I. Alexandrova, N. J. Cox // In: Osterhaus A. D. M. E., Cox N., Hampson A. W. (ed.), *Proceedings of "Options for the Control of Influenza IV"*. Hersonissos, Crete, Greece, 23-28 September. - Amsterdam: Elsevier, 2000. - P. 955-959.
323. Klimov, A.I. 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.I. Klimov, I.V. Kiseleva, J.A. Desheva et. al. // *Proceedings of the World Congress on Options for the Control of Influenza IV held in Crete, Greece, 23rd -28th September, 2000. Amsterdam - London-New-York-Oxford-Paris-Shannon-Singapore-Tokyo.:* Excerpta Medica. - 2001. - P. 951-954.

324. Kobasa, D. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus / D. Kobasa, S.M. Jones, K. Shinya et al. // *Nature*. - 2007. - 445 (7125). - P. 319-323.
325. Krammer, F. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines / F. Krammer, P. Palese // *Curr Opin Virol*. - 2013. - 3 (5). - P. 521-530.
326. Krizanova, O. Serum inhibitors of myxoviruses / O. Krizanova, V. Rathova // *Curr Top Microbiol Immunol*. - 1969. - 47. - P. 125-151.
327. Krystal, M. Sequential mutations in hemagglutinins of influenza B virus isolates: definition of antigenic domains / M. Krystal, J.F. Young, P. Palese et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1983. - 80 (14). - P. 4527-4531.
328. Kuiken, T. Avian H5N1 influenza in cats / T. Kuiken, G. Rimmelzwaan, D. Van Riel, et al. // *Science*. - 2004. - 306 (5694). - P. 241.
329. Kucharski, A.J. Transmission potential of influenza A(H7N9) virus, China, 2013-2014 [Электронный ресурс] / A.J. Kucharski, H.L. Mills, C.A. Donnelly, S. Riley // *Emerg Infect Dis*. - 2015. - 21(5). - P. 852-855. - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2105.141137>.
330. Kung, H. C. Influenza in China in 1977: recurrence of influenza A subtype H1N1 / H.C. Kung, K.F. Jen, W.C. Yuan et al. // *Bull. W.H.O.* -1978. - 56. - P. 913-918.
331. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. [Электронный ресурс] // 2016. - Режим доступа: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
332. Lakadamyali, M. Visualizing infection of individual influenza viruses / M. Lakadamyali, M.J. Rust, H.P. Babcock, X. Zhuang // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2003. - 100 (16). - P.9280-9285.
333. Larionova, N. Naturally occurring temperature-sensitive strains of influenza B virus / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Isakova, O. Litvinova, A.Klimov, L. Rudenko // Abstract book of "IVW-2004 Conference". Lisbon, Portugal. - 2004. - P. 92-97.
334. Larionova, N. MDCK cells as a tool for screening temperature sensitive live influenza vaccine candidate reassortants / I. Kiseleva, N. Larionova, I. Isakova, E. Oleynik, L. Rudenko // *Proceedings of Options for the Control of Influenza VI*. Toronto, Ontario, Kanada, 2007. - P. 588-590.
335. Larionova, N. Phenotypic and genetic peculiarities of influenza B/USSR/60/69 master donor strain based reassortants/ N. Larionova, I. Kiseleva, L. Rudenko // *Proceedings of Options for the Control of Influenza VI*. Toronto, Ontario, Kanada, 2007. - P. 415-416.
336. Larionova, N. Phenotypic characteristics of novel swine-origin influenza A/California/07/2009 (H1N1) virus / I. Kiseleva, N. Larionova, V. Kuznetsov, L. Rudenko // *Influenza Other Respir Viruses*. - 2009. - 4 (1). - P. 1-5.

337. Larionova, N. 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.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, N. Larionova, S.K.M. Drieszen-van der Cruijssen, S.M.C. Basten, J.G.M. Heldens, J.F. van den Bosch, L. Rudenko // *J Gen Virol.* - 2010 (Pt 4). - 91. - P. 931-937.
338. Larionova, N. Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries / L. Rudenko, H. Van den Bosch, I. Kiseleva, A. Mironov, A. Naikhin, N. Larionova, D. Bushmenkov // *Supplement Vaccine.*- 2011. - 29 (S.1). - P. A40-A44.
339. Larionova, N. Study of transmissibility of wild type and cold-adapted influenza viruses in guinea pigs / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Bazhenova, I. Dubrovina, L. Rudenko // In: *Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, Influenza Other Respir Viruses.* - 2011.-5(suppl.1). - P. 304-307.
340. Larionova, N. Peculiarities of reassortment of cold-adapted influenza A master donor virus with viruses possessed avian origin HA and NA H5N1 / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Dubrovina, E. Bazhenova, L. Rudenko // In: *Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, Influenza Other Respir Viruses.* - 2011.-5(suppl.1). - P. 347-349.
341. Larionova, N. Development of pandemic Live Attenuated Influenza vaccine (LAIV) in Russia / L. Rudenko, I. Kiseleva, A. Mironov, J. Desheva, N. Larionova, S. Donina, G. Petuchova, D.Korenkov, A. Rekstin, A. Naikhin // In: *Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, Influenza Other Respir Viruses.* - 2011.-5(suppl.1). - P. 333-337.
342. Larionova, N. Efficacy of live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 influenza in ferrets / K. J. Stittelaar, E. J.B. V. Kroeze, L. de Waal, G. van Amerongen, J. M.A. van den Brand, J.H. Simon, I.Kiseleva, N. Larionova, L. Rudenko, R. Dhere, S. Thirapakpoomanunt, M.P. Kieny, A.D.M.E. Osterhaus // *Vaccine.* - 2011. - 29 (49). - P. 9265- 9270.
343. Larionova, N. Live cold-adapted attenuated vaccine against H5N1 influenza viruses / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Fedorova, I. Dubrovina, E. Bazhenova, T. M. Ross, L. Rudenko// *Journal of Medical Safety.* - 2013. - P. 36-41.
344. Larionova, N. Live attenuated influenza vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza: development and preclinical characterization / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Isakova-Sivak, A. Rekstin, I. Dubrovina, E. Bazhenova, T. M. Ross, D. Swayne, L. Gubareva,

- V. Tsvetnitsky, E. Fedorova, E. Doroshenko, L. Rudenko // *Journal of Vaccines and Vaccination*. - 2013.-4 (8).- P. 1-11.
345. Larionova, N. Application of real time RT-PCR for the genetic homogeneity and stability tests of the seed candidates for live attenuated influenza vaccine production / S. Shcherbik, S.B.Sergent, W.G. Davis, B. Shu, J. Barnes, I. Kiseleva, N. Larionova, A. Klimov, T. Bousse // *J Virol Methods*. - 2014. - 195. - P. 18-25.
346. Larionova, N. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to sera inhibitors and reassortment efficiency / N. Larionova, I. Kiseleva, E. Fedorova, E. Bazhenova, I. Dubrovina, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko // *The Open Microbiol J*. - 2014. - 8. - P. 59-70.
347. Larionova, N.V. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to serum inhibitors and reassortment efficiency / N.V. Larionova, I.V. Kiseleva, E.A. Bazhenova, E.A. Fedorova, I.A. Dubrovina, I.N. Isakova-Sivak, L.G. Rudenko // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. - 2014. - 29 (3). - P. 130-138.
348. Larionova, N. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study / L. Rudenko, I. Kiseleva, M. Stukova, M. Erofeeva, A. Naykhin, S. Donina, N. Larionova, M. Pisareva, V. Krivitskaya, J. Flores, I. Dubrovina, I. Isakova-Sivak, G. Petukhova, E. Bazhenova, T. Smolonogina, V. Kuznetsova, A. Nikiforova, O. Kiselev, M. Power, V. Tsvetnitsky, J. C. Victor, K. M. Neuzil // *Vaccine*. - 2015. - 33(39). - P. 5110-5117.
349. Larionova, N. New Methodological Approaches in the development of Russian live attenuated vaccine for pandemic influenza / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Fedorova, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko // *Translational Biomedicine*. - 2015. - 6. - 2 (13). - P. 1-9.
350. Larionova, N. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses /S. Shcherbik, N. Pearce, I. Kiseleva, N. Larionova, L. Rudenko, X. Xu, D. E. Wentworth, T. Bousse // *J Virol Methods*. - 2016. - 227. - P. 33-39.
351. Larionova, N. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses / I. Kiseleva, I. Dubrovina, E. Fedorova, N. Larionova, I. Isakova-Sivak, E. Bazhenova, M. Pisareva, V. Kuznetsova, J. Flores, L. Rudenko // *Vaccine*. - 2015. - 33 (49). - P. 7008-7014.
352. Laursen, N.S. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses / N.S. Laursen, I.A. Wilson // *Antiviral Res*. - 2013. - 98 (3). - P. 476-483.
353. Lemey, P. Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2 / P. Lemey, A. Rambaut, T. Bedford et al // *PLoS Pathog*. - 2014. - 10 (2). - P. 1-10.

354. Leyva-Grado, V.H. Influenza virus infection in guinea pigs raised as livestock / V.H. Leyva-Grado, S. Mubareaka, F. Krammer, et al. // Ecuador. Emerg. Infect. Dis. - 2012. - 18 (8). - P.1135-1138.
355. Lewis, N.S. Substitutions near the hemagglutinin receptor-binding site determine the antigenic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. swine / N.S. Lewis, T.K. Anderson, P. Kitikoon et al. // J Virol. - 2014. - 88 (9). - P. 4752-4763.
356. Li, C. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses / C. Li, M. Hatta, S. Watanabe et al. // J Virol. - 2008. - 82 (23). - P. 11880-11888.
357. Li, C. Avian influenza vaccines against H5N1 "bird flu" / C. Li, Z. Bu, H. Chen // Trends Biotechnol. - 2014. - 32 (3). - P. 147-156.
358. Li, X. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA / X. Li, P. Palese // J Virol. - 1994. - 68 (2). - P. 1245-1249.
359. Li, Z. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model / Z. Li, H. Chen, P. Jiao et al. // J Virol. - 2005. - 79 (18). - P. 12058-12064.
360. Liang, L. Genetics, Receptor Binding, Replication, and Mammalian Transmission of H4 Avian Influenza Viruses Isolated from Live Poultry Markets in China / L. Liang, G. Deng, J. Shi et al. // J Virol. - 2016. - 90 (3). - P. 1455-1469.
361. Lin, Y.P. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin / Y.P. Lin, X. Xiong, S.A. Wharton et al. // Proc Natl Acad Sci USA. - 2012. - 109 (52). - P. 21474-21479.
362. Lindstrom, S.E. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events / S.E. Lindstrom, N.J. Cox, A. Klimov // Virology. - 2004. - 328 (1). - P.101-119.
363. Litvinova, O. The etiological surveillance for influenza in Russia during the seasons 1993-2003 / O. Litvinova, N. Konovalova, T. Lobova // International Congress Series 1263. - 2004. - P. 295-298.
364. Liu, M. The Functional Study of the N-Terminal Region of Influenza B Virus Nucleoprotein / M. Liu, M.K. Lam, Q. Zhang et al. // PLoS One. - 2015. - 10 (9). - P. 1-12.
365. Lopez-Martinez, I. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N3) Virus in Poultry Workers, Mexico, 2012 [Электронный ресурс] / I. Lopez-Martinez, A. Balish, G. Barrera-Badillo et al. // CDC. Emerging of Infectious Diseases. - 2013. - 19 (9). - Режим доступа: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/9/13-0087_article.
366. Lowen, A.C. Transmission in the guinea pig model / A.C. Lowen, N.M. Bouvier, J. Steel // Curr Top Microbiol Immunol. - 2014. - 385. - P. 157-183.

367. Lugovtsev, V.Y. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs / V.Y. Lugovtsev, D.F. Smith, J.P. Weir // *Virology*. - 2009. - 394 (2). - P. 218-226.
368. Ma, W. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States / W. Ma, A.L. Vincent, M.R. Gramer et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2007. - 104 (52). - P. 20949-20954.
369. Maassab, H. F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C / H. F. Maassab // *Nature*. - 1967. - P. 612-614.
370. Maassab, H. F. Plaque formation of influenza virus at 25 degrees C / H. F. Maassab // *Nature*. - 1968. - P. 645-646.
371. Maassab, H.F. Characterization of an influenza A host range mutant / H.F. Maassab, D.C. DeBorde // *Virology*. -1983. - 130 (2). - P. 342-350.
372. Maassab, H. F. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines / H.F. Maassab, D.C. DeBorde // *Vaccine*. - 1985. - 3 (5). - P. 355-369.
373. Maassab, H.F. Live influenza vaccine / H.F. Maassab, J.R. LaMontagne, D.C. DeBorde // In "Vaccines". - Ed. S.A. Plotkin, E.A. Mortimer. New York, 1988. - P.435-457.
374. Maassab, H.F. Cold-adapted influenza viruses for use as live vaccines for man / H.F. Maassab, C.A. Heilman, M.L. Herolocher // *Advances in Biotechnological Processes*. - 1990. -14. - P. 203-242.
375. Maassab, H.F. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans / H.F. Maassab, M.L. Bryant // *Rev Med Virol*. - 1999. - 9 (4). - P. 237-244.
376. Maines, T.R. Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model / T.R. Maines, L.M. Chen, Y. Matsuoka et al. // *PNAS USA*. - 2006. - 103 (32). - P. 12121-12126.
377. Maines, T.R. Transmission and pathogenesis of swine origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice / T.R. Maines, A. Jayaraman, J.A. Belser et al. // *Science*. - 2009. - 325 (5939). - P. 484-487.
378. Mallory, R. M. Shedding of Ann Arbor strain live attenuated influenza vaccine virus in children 6-59 months of age / R.M. Mallory, Yi T., C. S. Ambrose // *Vaccine*. - 2011. - 29 (26). - P. 4322-4327.
379. Marshall, N. Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch / N. Marshall, L. Priyamvade, Z. Ende et al. // *PLOS Path*. - 2013. - 9 (6). - P. 1-11.
380. Martin, K. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus / K. Martin, A. Helenius // *J Virol*. - 1991. - 65 (1). - P.232-244.

381. Massin, P. Residue 627 of PB2 Is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses / P. Massin, S. van der Werf, N. Naffakh // *J Virol.* -2001. -75(11). - P. 5398–5404.
382. Matrosovich, M.N. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site / M.N. Matrosovich, A.S. Gambaryan , S. Teneberg et al. // *Virology.* - 1997. - 233 (1). - P. 224-234.
383. Matrosovich, M. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host / M. Matrosovich, P. Gao, Y. Kawaoka // *J Virol.* - 1998. - 72 (8). - P. 6373-6380.
384. Matrosovich, M. The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties / M. Matrosovich, N. Zhou, Y. Kawaoka, R. Webster // *J Virol.* - 1999. - 73 (2). - P. 1146-1155.
385. Matrosovich, M. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals / M. Matrosovich, A. Tuzikov, N. Bovin et al. // *J Virol.* - 2000. - 74 (18). - P. 8502-8512.
386. Matrosovich, M.N. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium / M.N. Matrosovich, T.Y. Matrosovich, T. Gray // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2004. - 101 (13). - P. 4620-4624.
387. Matrosovich, M.N. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium / M.N. Matrosovich, T.Y. Matrosovich, T. Gray et al. // *J Virol.* - 2004. - 78 (22). - P. 12665-12667.
388. Matrosovich, M. Influenza receptors, polymerase and host range / M. Matrosovich, J. Stech, H.D. Klenk // *Rev Sci Tech.* - 2009. - 28 (1). - P. 203-217.
389. Matsuoka, Y. Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice / Y. Matsuoka, D.E. Swayne, C. Thomas // *J Virol.* - 2009. - 83(9). - p. 4704-4708.
390. Matsuoka, Y. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle / Y. Matsuoka, H. Matsumae, M. Katoh et al. // *BMC Systems Biology.* - 2013. - 7 (97). - P. 1-18.
391. McCauley, J.W. The critical cut-off temperature of avian influenza viruses / J.W. McCauley, C.R. Penn // *Virus Research.* - 1990. -17(3). -P. 191–198.
392. Medeiros, R. Hemagglutinin residues of recent human A (H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes / R. Medeiros, N. Escriou, N. Naffakh et al. // *Virology.* - 2001. - 289 (1). - P. 74-85.

393. Mehle, A. Unusual influenza A viruses in bats / A. Mehle // *Viruses*. - 2014. - 6 (9). - P. 3438-3449.
394. McAuley, J.L. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia / J.L. McAuley, F. Hornung, K.L. Boyd et al. // *Cell Host Microbe*. - 2007. - 2 (4). - P. 240-249.
395. McCown, M.F. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging / M.F. McCown, A. Pekosz // *J Virol*. - 2005. - 79 (6). - P. 3595-3605.
396. McCullers, J.A. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003 / J.A. McCullers, S. Takehiko, A.R. Iverson // *J Virol*. - 2004. - 78 (23). P. 12817-12828.
397. Mills, J. Temperature-sensitive mutants of influenza virus I. Behaviour in tissue culture and in experimental animals / J. Mills, R.M. Chanock // *J Infect Dis*. - 1971. - 123. - P. 145-157.
398. Monto, A. Modification of an outbreak of influenza in Tecumseh, Michigan by vaccination of schoolchildren / A. Monto, F. Davenport, J. Napier et al. // *J Infect Dis*. - 1970. - 122 (1). - P. 16-25.
399. Monto, A.S. Evaluation of an attenuated, cold-recombinant influenza B virus vaccine / A.S. Monto, F.D. Miller, H.F. Maassab // *J. Infect. Dis*. - 1982. - 145 (1). - P. 57-64.
400. Monto, A.S. Seasonal influenza vaccinations: specialized products for different target groups // *Vaccine*. - 2010. - Suppl 4. - D14-23.
401. Monto, A.S. Influenza pandemics: history and lessons learned / A.S. Monto, R.G. Webster // P.20-33. In: *Textbook of influenza*. - Ed.: A.S. Monto, R.G. Webster, T.J. Braciale, R.A. Lamb, UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
402. Morens, D.M. The persistent legacy of the 1918 influenza virus / D.M. Morens, J.K. Taubenberger, A.S. Fauci // *N Engl J Med*. - 2009. - 361 (3). - P. 225-229.
403. Morishita, T. Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes / T. Morishita, E. Nobusawa, K. Nakajima, S. Nakajima // *J Gen Virol*. - 1996. - 77 (Pt 10). - P. 2499-2506.
404. Munster, V.J. The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses, / V.J. Munster, E. de Wit, D. van Riel // *J Infect Dis*. - 2007. - 196 (2). - P. 258-265.
405. Murabeka, S. Influenza virus: the biology of a changing virus / S. Murabeka, P. Palese // P. 3-26. In: *Influenza vaccines for the future*. - Ed.: R. Rappuoli, G. Del Giudice, AG: Springer Basel, 2nd edition, 2011. - 447 p.
406. Muramoto, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA / Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami et al. // *J Virol*. - 2013. - 87 (5). - P. 2455-2462.

407. Morens, D.M. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine / D.M. Morens, J.K. Taubenberger // *Influenza Other Respir Viruses*. - 2010. - 4 (6). - P. 327-37.
408. Murphy, B.R. Temperature-sensitive mutants of influenza virus II. Attenuation of ts recombinants for man / B.R. Murphy, E.G. Chalhub, S.R. Nusunoff, R.M. Chanock // *J. Infect. Dis.* - 1972. - 126 (2) - P. 170-178.
409. Murphy, B.R. Evaluation of influenza A/Hong Kong/123/77 (H1N1) ts-1A2 and cold-adapted recombinant viruses in seronegative adult volunteers / B.R. Murphy, M.B. Rennels, R.G. Douglas et al. // *Infect Immun.* - 1980. - 29 (2). - P. 348-355.
410. Murphy, B.R. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus / B.R. Murphy, M.L. Clements / In: *Current topics in microbiology and immunology. New strategies for oral immunization*. Ed. J. Mestecky, J.R. McGhee. - Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. - P. 107-114.
411. Murphy, B.R. Use of live attenuated cold-adapted influenza A reassortant virus vaccines in infants, children, young adults, and elderly adults / B.R. Murphy // *Infectious Diseases in Clinical Practice*. - 1993. - 2 (3). - P. 174-181.
412. Moya, A. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses / A. Moya, E.C. Holmes, F. Gonzales-Candelas // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2004. - 2 (4). - P. 279-288.
413. Nakajima K. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950 / K. Nakajima, U. Desselberger, P. Palese // *Nature*. - 1978. - 274 (5669). - P. 334-339.
414. Nayak, D.P. Assembly and budding of influenza virus / D.P. Nayak, E.K. Hui, S. Barman // *Virus Res.* - 2004. - 106 (2). - P. 147-165.
415. Nayak, D.P. Structure and replication / D.P. Nayak, S. Shivakoty, R.A. Balogun et al. P. 37-56. In: *Textbook of influenza*. - Ed.: A.S. Monto, R.G. Webster, T.J. Braciale, R.A. Lamb, UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
416. Nelson, M.I. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface / M.I. Nelson, A.L. Vincent. // *Trends Microbiol.* - 2015. - 23 (3). - P. 142-53.
417. Nerome, R. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism / R. Nerome, Y. Hiromoto, S. Sugita et al. // *Arch Virol.* - 1998. - 143 (8). - P. 1569-1583.
418. Neumann, G. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNA / G. Neumann, T. Watanabe, H. Ito et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1999. - 96 (16). - P. 9345-9350.

419. Neumann, G. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation / G. Neumann, G.G. Brownlee, E. Fodor, Y. Kawaoka // *Curr Top Microbiol Immunol.* - 2004. - 283. - P. 121-143.
420. Neumann, G. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus / G. Neumann, T. Noda, Y. Kawaoka // *Nature.* - 2009. - 459 (7249). - P. 931-939.
421. Neumann, G. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties / G. Neumann, H. Chen, G.F. Gao et al. // *Cell research.* - 2010. - 20 (1). - P. 511-61.
422. Ng, A.K.L. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein / A.K.L. Ng, M.K-H. Lam, H. Zhang et al. // *J Virol.* - 2012. - 86 (12). - P. 6758-6767.
423. Nichol, K.L. Vaccines for seasonal and pandemic influenza / K.L. Nichol, J.J. Treanor // *J Infect Dis.* - 2006. - 194 (2). - P. 111-118.
424. Nishikawa, F. Direct isolation of H1N2 recombinant virus from a throat swab of a patient simultaneously infected with H1N1 and H3N2 influenza A viruses / F. Nishikawa, T. Sugiyama // *J Clin Microbiol.* - 1983. - 18 (2). - P. 425-427.
425. Nobusawa, E. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides / E. Nobusawa, H. Ishihara, T. Morishita et al. // *Virology.* - 2000. - 278 (2). - P. 587-596.
426. Noda, T. Packaging of influenza virus genome: Robustness of selection / T. Noda, Y. Kawaoka // *PROC NATL ACAD SCI.* - 2012. - 109 (23). - P. 8797-8798.
427. Norkin, L.C. Orthomyxoviruses / L.C. Norkin // In: *Virology. Molecular biology and pathogenesis.* - 2010. - Washington DC, USA: Asm Press American Society Microbiol. - P. 296-345.
428. Ohishi, K. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*) / K. Ohishi, A. Ninomiya, H. Kida et al. // *Microbiol. and Immunol.* - 2002. - 46 (9). - P. 639-644.
429. Olsen, B. Global patterns of influenza A virus in wild birds / B. Olsen, V.J. Munster, A. Wallensten et al. // *Science.* - 2006. - 312 (5772). - P. 384-388.
430. O'Neill, R.E. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins / R.E. O'Neill, J. Talon, P. Palese // *EMBO J.* - 1998. - 17 (1). - P. 288-296.
431. Ortiz, J.R. 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.R. Ortiz, D. Goswami, K. D.C. Lewis et al. // *Vaccine.* - 2015. - 33 (29). - P. 3415-3421.

432. Osterhaus, A.D. Influenza B virus in seals / A.D.M.E. Osterhaus, G.F. Rimmelzwaan, B.E.E. Martina et al. // *Science*. - 2000. - 288 (5468). - P. 1051-1053.
433. Osterhaus, A. Towards universal influenza vaccines? / A. Osterhaus, R. Fouchier, G. Rimmelzwaan // *Philos*. - 2011. - 366 (1579). - P. 2766-2773.
434. Oxford, J.S. Naturally occurring temperature-sensitive influenza A viruses of the H1N1 and H3N2 subtypes / J.S. Oxford, T. Corcoran, G.C. Schild // *J Gen Virol*. -1980. - 48 (Pt 2). - P.383–389.
435. Oxford, J.S. Conquest of viral disease: a topical review of drug and vaccines / J.S. Oxford, Bo. Öberg // Netherlands: Elsevier, 1985. - 708 p.
436. Palese, P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / P. Palese, M.L. Shaw, D.M. Knipe et al. // In D.M. Knipe et al. eds. *Fields Virology*. 5-th ed. - 2007. - Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. - P. 1647-1690.
437. Palese, P. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis [Электронный ресурс] / P. Palese, T.T. Wang // *MBio*. - 2011. - 2 (5 e00150-11). - Режим доступа: doi:10.1128/mBio.00150-11.
438. Paragas, J. Influenza B and C Virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities / J. Paragas, J. Talon, R.E. O'Neill et al. // *J.Virol*. - 2001. - 75 (16). - P. 7375-7383.
439. Parrish, C.R. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases / C.R. Parrish, E.C. Holmes, D.M. Morens et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2008. - 72 (3). - P. 457-470.
440. Park, Y.W. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation / Y.W. Park, M.G. Katze // *J Biol Chem*. - 1995. - 270 (47). - P. 28433-28439.
441. Parks, C.L. Phenotypic properties resulting from directed gene segment reassortment between wild-type A/Sydney/5/97 influenza virus and the live attenuated vaccine strain / C.L. Parks, T. Latham, A. Cahill et al. // *Virology*. - 2007. - 367 (2). - P. 275-287.
442. Parvin, J.D. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1 / J.D. Parvin, A. Moscona, W.T. // *J Virol*. - 1986. - 59 (2). - P. 377-383.
443. Paterson, D. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP) / D. Paterson, E. Fodor // *PLOS Pathogens*. - 2012. - 8 (12). - P. 1-8.
444. Paulson, J. C. Interactions of animal viruses with cell surface receptors / ed. P.M. Conn // "The Receptors" USA: Acad. Press, 1985. - 2. - P. 131-219.
445. Peetermans, J. Live influenza virus vaccines and preparation thereof. US patent. 1976. Patent number: 3953592. Filing date: Sep 27, 1973. Issue date: Apr 27, 1976.

446. Peng, L. Molecular characterization of H9N2 influenza virus isolated from mink and its pathogenesis in mink / L. Peng, C. Chen, H. Kaiyi et al. // *Vet Microbiol.* - 2015. - 176 (1-2). - P. 88-96.
447. Perdue, M.L. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses / M.L. Perdue, M. García, D. Senne, M. Fraire // *Virus Res.* - 1997. - 49 (2). - P. 173-186.
448. Phair, J.P. Influenza virus infection of the guinea pig: immune response and resistance / J.P. Phair, C.A. Kauffman, R. Jennings, C.W. Potter // *Med Microbiol Immunol.* - 1979. - 165 (4). - P. 241-254.
449. Polezhaev, F.I., Garmashova L.M., Koval N.A. et al. Attenuated ts recombinants of influenza A/USSR/77 (H1N1) virus obtained by crossing with the cold-adapted donor A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus // *Acta Virol.* - 1982. - 26. - P. 221.
450. Poole, D.S. Influenza A virus polymerase is a site for adaptive changes during experimental evolution in bat cells / D.S. Poole, S. Yú, Y. Cai et al. // *J Virol.* - 2014. - 88 (21). - P. 12572-12585.
451. Pritchett, T.J. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin / T.J. Pritchett, J.C. Paulson // *J Biol Chem.* - 1989(17). - 264. - P.9850-9858.
452. Puzelli, S. Human infection with highly pathogenic A(H7N7) avian influenza virus. Italy, 2013 [Электронный ресурс] / S. Puzelli, G. Rossini, M. Facchini et al. // *CDC. Emerging of Infectious Diseases.* - 2014. - 20 (10) - Режим доступа: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/10/14-0512_article.
453. Rambaut, A. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus / A. Rambaut, O.G. Pybus, M.I. Nelson et al. // *Nature.* - 2008. - 453 (7195). - P. 615-619.
454. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *Amer J Hygiene.* - 1938. - 27 (3). - P. 493-497.
455. Reeve, P. Studies with a cold-recombinant A/Victoria/3/75 (H3N2) virus. I. Biologic, genetic, and biochemical characterization / P. Reeve, J.W. Almond, V. Felsenreich et al. // *J. Infect. Dis.* - 1980. - 142 (6). - P. 850-856.
456. Reid, A.H. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene / A.H. Reid, T.G. Fanning, J.V. Hultin, J.K. Taubenberger // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1999. - 96 (4). - P. 1651-1656.
457. Reid, A.H. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus / A.H. Reid, J.K. Taubenberger, T.G. Fanning // *Nat Rev Microbiol.* - 2004. - 2 (11). - P. 909-914.

458. Ren, X.W. Antigenic and genetic variation in the hemagglutinins of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses in the Shanghai area from 2005 to 2008 / X.W. Ren, L.W., J.X. Ju, Yang // *Journal of Medical Virology*. - 2011. - 83 (7). - P. 1113-1120.
459. Robertson, J.S. Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus / J.S. Robertson, C. Nicolson, J.S. Bootman et al. // *J Gen Virol*. - 1991. - 72 (Pt 11). - P. 2671-2677.
460. Rogers, G.N. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants / G.N. Rogers, T.J. Pritchett, J.L. Lane et al. // *Virology*. - 1983. - 131 (2). - P. 394-408.
461. Rogers, G.N. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates / G.N. Rogers, B.L. D'Souza // *Virology*. - 1989. - 173 (1). - P. 317-22.
462. Romanova, J. Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line / J. Romanova, D. Katinger, B. Ferko et al. // *Virus Res*. - 2004. - 103 (1-2). - P. 187-193.
463. Roos, R. CIDRAP News - Quadrivalent flu vaccines coming; companies cite good demand. [Электронный ресурс]. - 2013. - Режим доступа: www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2013/08/quadrivalent-flu-vaccines-coming-companies-cite-good-demand.
464. Rosenthal, P.B. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus / P.B. Rosenthal, X. Zhang, F. Formanowski et al. // *Nature*. - 1998. - 396 (6706). - P. 92-96.
465. Rota, P. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 / P. Rota, T.R. Wallis, M.W. Harmon et al. // *Virology*. - 1990. - 175 (1). - P. 59-68.
466. Rota, P.A. Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus / P.A. Rota, M.L. Hemphill, T. Whistler et al. // *J. Gen. Virol*. - 1992. - 73 (Pt 10). - P. 2737-2742.
467. Roy, T. Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006-2010 revealed co-circulation of Yamagata-like and Victoria-like strains in eastern India / T. Roy, A.S. Agrawal, A. Mukherjee et al. // *Infect Genet Evol*. - 2011. - 11 (7). - P. 1595-1601.
468. Rozo, M. The Reemergent 1977 H1N1 Strain and the Gain-of-Function Debate [Электронный ресурс] / M. Rozo, G.K. Gronvall // *mBio*. - 2015. - 6 (4). - Режим доступа: e01013-15.
469. Rudenko, L.G. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia / L.G. Rudenko, A.N. Slepushkin, A.S. Monto // *J. Infect. Dis*. - 1993. - 168 (4). - P. 881-887.

470. Rudenko, L.G. Clinical and epidemiological evaluation of a live, cold-adapted influenza vaccine for 3 - 14-year-olds / L.G. Rudenko, N.I. Lonskaya, A.I. Klimov // Bull. WHO. - 1996. - 74 (1). - P. 77-84.
471. Rudenko, L.G. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents / L.G. Rudenko, N.H. Arden, E. Grigorieva et al. // Vaccine. - 2000. - 19 (2-3). - P. 308-318.
472. Rudenko, L.G. Current strategies for the prevention of influenza by the Russian cold-adapted live influenza vaccine among different populations / L.G. Rudenko, G.I. Alexandrova // International Congress Series, - 2001. - 1219. - P. 945-950.
473. Rudenko, L. Live attenuated influenza vaccine in Russia [Электронный ресурс] // L. Rudenko // 2-nd WHO meeting on influenza vaccines that induce broad spectrum and long-lasting immune response. - 2005. Geneva. - Режим доступа: www.who.int/vaccine_research/disease/influenza/Rudenko.pdf.
474. Rudenko, L.G. Fifty years experience with live attenuated influenza vaccines in Russia / L.G. Rudenko // WHO. Options for live attenuated influenza vaccines (LAIV) in the control of epidemic and pandemic. - 12 - 13 June 2007.
475. Rudenko, L.G. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials) / L.G. Rudenko, J. Desheva, S. Korovkin et al. // Influenza Other Respir Viruses. - 2008. - 2 (6). - P. 203-209.
476. Rudenko, L.G. H7N3 live attenuated influenza vaccine has a potential to protect against new H7N9 avian influenza virus / L.G. Rudenko, I. Isakova-Sivak, S. Donina // Vaccine. - 2013. - 31 (42). - P. 4702-4705.
477. Rudenko, L. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine / L. Rudenko, I. Kiseleva, A.N. Naykhin, et al. // PLoS One. - 2014. - 9 (2). - P.1-12.
478. Rudenko, L.G. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study / L. Rudenko, I. Kiseleva, M. Stukova et al. // Vaccine. - 2015. - 33 (39). - P. 5110-5117.
479. Rudenko, L.G. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / L. Rudenko, I. Isakova-Sivak, A. Naykhin et al. // Lancet Infect Dis. - 2016 - 16 (3). -P. 303-310.

480. Rudneva, I.A. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants / I.A. Rudneva, T.A. Timofeeva, A.A. Shilov et al. // *Arch Virol.* - 2007. - 152 (6). - P. 1139-1145.
481. Ruigrok, R.W. Membrane interaction of influenza virus M1 protein / R. W. Ruigrok, A. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma, G.R. Whittaker // *Virology.* - 2000. - 267 (2). - P. 289-298.
482. Russell, C.A. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses / C.A. Russell, T.C. Jones, I.G. Barretal. // *Science.* - 2008. - 320 (5874). - P.340-346.
483. Russel, R.J. Influenza glycoproteins: hemagglutinin and neuraminidase / J.R Russel, S.J. Gamblin, J.J. Skehel // P. 67-100. In: *Textbook of influenza.* - Ed.: R.G. Webster, A.S. Monto, T.J. Braciale, R.A. Lamb. - UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
484. Ryan-Poirier, K.A. Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans / K.A. Ryan-Poirier, Y. Suzuki, W.J. Bean et al. // *Virus Research.*- 1998.- Vol.56 (2).- P. 169-176.
485. Scheiffele, P. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain / P. Scheiffele, M.G. Roth, K. Simons // *EMBOJ.* - 1997. - 16 (18). - P. 5501-5508.
486. Schneider, J. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: do they play a role in viral mRNA export? / J. Schneider, T. Wolff // *Vaccine.* - 2009. - 27 (45). - P. 6312-6316.
487. 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. - 87 (1). - P. 13-20.
488. Scholtissek, C. Pigs as the “mixing vessel” for the creation of new pandemic influenza A viruses / C. Scholtissek // *Med Principl Prac.* - 1990/1991. - 2. - p. 65-71.
489. Scholtissek, C. Source for influenza pandemics / C. Scholtissek // *Eur J Epidemiol.* - 1994. - 10 (4). - P. 455-458.
490. Schweiger, B. Antigenic drift and variability of influenza viruses / B. Schweiger, I. Zadow, R. Heckler // *Med Microbiol Immunol.* - 2002. - 191(3-4). P. 133-138.
491. Seo, S.H. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses / S.H. Seo, E. Hoffmann, R.G. Webster // *Virus Res.* - 2004. - 103 (1-2). - P. 107-113.
492. Shaw, M.W. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons / M.W. Shaw, X. Xu, Y. Li et al. // *Virology.* - 2002. - 303 (1). - P. 1-8.

493. Sherry, L. The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome / L. Sherry, M. Smith, S. Davidson, D. Jackson // *J Virol.* - 2014. - 88 (21). - P. 12326-12338.
494. Shi, Y. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses / Y. Shi, Y. Wu, W. Zhang // *Nature Reviews Microbiology.* - 2014. - 12 (12). - P.822-831.
495. Shinya, K. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway / K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada et al. // *Nature.* - 2006. - 440 (7083). - P. 435-436.
496. Short, K.R. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus / K.R. Short, M. Richard, J. H. Verhagen et al. // *One Health.* - 2015. - 1. - P. 1-13.
497. Shortridge, K.F. Pandemic influenza: a zoonosis? / K.F. Shortridge // *Semin Respir Infect.* 1992. - 7 (1). - P. 11-25.
498. Shtyrya, Y.A. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function / Y.A. Shtyrya, L.V. Mochalova, N.V. Bovin // *Acta Naturae.* - 2009. - 1 (2). - P. 26-32.
499. Simonsen, L. Global mortality estimates for the 2009 influenza pandemic from the GLaMOR project: a modeling study / L. Simonsen, P. Spreuwenberg, R. Lustig et al. // *PLOS Medicine.* - 2013. - 10 (11). - P. 1 -17.
500. Skehel, J.J. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin / J.J. Skehel, D.C. Wiley // *Annu Rev Biochem.* - 2000. - 69 (1). - P. 531-569.
501. Smith, D.B. The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review / D.B. Smith, S.C. Inglis // *J Gen Virol.* - 1987. - 68 (11). - P. 2729-2740.
502. Smith, G.J, Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China / GJ Smith, X.H. Fan , J. Wang et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2006. - 103 (45). - P. 16936-16941.
503. Smith, G.J. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic / G.J. Smith, D. Vijaykrishna, J. Bahl et al. // *Nature.* - 2009. - 459 (7250). - P. 1122-1125.
504. Smorodintsev, A. A. Applied Virology / A. A. Smorodintsev, G. A. Alexandrova, O. M. Chalkina, A. A. Selivanov ed. M. Saunders, E.H. Lennette // 1st Annual Symposium, Boca Raton, Florida, 1964, Sheboygan, Wisconsin, Ellis, 1965: p. 142. Smorodintseff, A.A. Investigation on volunteers infected with influenza virus / A.A. Smorodintseff, M.D., IA. Tushinsky, A.I. Drobyshchanskaya et al. // *Amer. J. Med. Sci.* - 1937. - 194 (2). - P. 159-170.
505. Songserm, T. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat / T. Songserm, A. Amonsin, R. Jam-on et al. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2006. - 12 (4). - P. 681-683.
506. Steinhauer, D.A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus // *Virology.* - 1999. - 258 (1). - P.1-20.

507. Stevens, J. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus / J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey et al. // *Science*. - 2006. - 312 (5772). - P. 404-410.
508. Stieneke-Gröber, A. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease / A. Stieneke-Gröber, V.M. Angliker H., E. Shaw // *EMBO J*. - 1992. - 11 (7). - 2407-2414.
509. Subbarao, E.K. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range / E.K. Subbarao, W. London, B.R. Murphy // *J. Virol*. - 1993. - 67 (4). - P. 1761-1764.
510. Subbarao, K. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? / Subbarao K., R.G. Webster, Y. Kawaoka, B.R. Murphy // *Virus research*. - 1995. - 39 (2-3). - P. 105-118.
511. Subbarao, K. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness / K. Subbarao, A. Klimov, J. Katz, et al. // *Science*. - 1998. - 279 (5349). - P.393-396.
512. Sugita, Y. Configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion / Y. Sugita, H. Sagara, T. Noda, Y. Kawaoka // *J Virol*. - 2013. - 87 (23). - P. 12879-12884.
513. Sun, S. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza a (H1N1) viruses [электронный ресурс] / S. Sun, Q. Wang, F. Zhao et al. // *PLoS One*. - 2011. - 6(7). - doi: 10.1371/journal.pone.0022844.
514. Sun, Y. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern / Y. Sun, J. Liu // *Protein Cell*. - 2015. - 6 (1). - P. 18-25.
515. Suzuki, Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza a viruses / Y. Suzuki, T. Ito, T. Suzuki et al. // *J Virol*. - 2000. - 74 (24). - P. 11825-11831.
516. Suzuki, Y. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes / Y. Suzuki, M.Nei // *Mol Biol Evol*. - 2002. - 19 (4). - P. 501-509.
517. Swayne, D.E. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza / D.E. Swayne // *Avian Dis*. - 2012. - 56 (Suppl. 4). - P. 818-828.
518. SWISS-MODEL, Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/SPDBV.shtml>.
519. Talaat, K.R. A Live Attenuated H7N3 Influenza Virus Vaccine is Well-tolerated and Immunogenic in a Phase I Trial in Healthy Adults / K.R. Talaat, R.A. Karron, K.A. Callahan et al. // *Vaccine*. - 2009. - 27 (28). - P. 3744-3753.
520. Talaat, K.R. An open-label phase I trial of a live attenuated H2N2 influenza virus vaccine in healthy adults / K.R.Talaat, R.A. Karron, P.H. Liang et al. // *Influenza Other Respir Viruses*. - 2013. - 7 (1). - P. 66-73.

521. Talbot, T.R. Duration of virus shedding after trivalent intranasal live attenuated influenza vaccination in adults / T.R. Talbot, D.D. Crocker, J. Peters et al. // *Infection control and hospital epidemiology*. - 2005. - 26 (5). - P. 494-500.
522. Tate, M.D. Playing hide and seek: how glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection / M.D. Tate, E.R. Job, Y.M. Deng et al. // *Viruses*. - 2014. - 6 (3). P. 1294-316.
523. Taubenberger, J.K. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus / J.K. Taubenberger, A.H. Reid, A.E. Krafft et al. // *Science*. - 1997. - 275 (5307). - P. 1793-1796.
524. Taubenberger, J.K. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation / J.K. Taubenberger, J.C. Kash // *Cell Host Microbe*. - 2010. - 7 (6). - P. 440-451.
525. Taubenberger, J.K. Influenza: The once and future pandemic / J.K. Taubenberger, D.M. Morens // *Public Health Rep*. - 2010. - 125 (Suppl 3). - P. 16-26.
526. Tauber, S. Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo / S. Tauber, Y. Ligertwood, M. Quigg-Nicol et al. // *J Gen Virol*. - 2012. - 93 (4). - P. 840-849.
527. Taylor, L.H. Risk factors for human disease emergence / L.H. Taylor, S.M. Latham, M.E. Woolhouse // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. - 2001. - 356 (1411). - P. 983-989.
528. Teeling, E.C. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record / E.C. Teeling, M.S. Springer, O. Madsen et al. // *Science*. - 2005. - 307 (5709). - P. 580-584.
529. Tong, S. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong, Y. Li, P. Rivailler et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2012. - 209 (11). - P. 4269-4274.
530. Tong, S. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *PLoS Pathog*. - 2013. - 9 (10). - P. 1-12.
531. Tosh, P.K. Flu myths: dispelling the myths associated with live attenuated influenza vaccine / P.K. Tosh, T.G. Boyce, G.A. Poland // *Mayo Clin Proc*. - 2008. - 83 (1). - P. 77-84.
532. Treanor, J. Evaluation of the genetic stability of the temperature-sensitive PB2 gene mutation of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted vaccine virus / J. Treanor, M. Perkins, B.R. Murphy // *J Virol*. - 1994. - 68 (12). - P. 7684.
533. Tumpey, T.M. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus / Tumpey T.M., García-Sastre A., Taubenberger J.K. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* 2004. - 101 (9). - P. 3166-3171.
534. Tumpey, T.M. Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus / T.M. Tumpey, C.F. Basler, P.V. Aguila et al. // *Science*. - 2005. - 310 (5745). - P. 77-80.

535. Tumpey, T.M. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission / T.M. Tumpey, T.R. Maines, N. Van Hoeven et al. // *Science*. - 2007. - 315 (5812). - P.655-659.
536. van Hoeven, N. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air / N. Van Hoeven, C. Pappas, J.A. Belser et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2009. - 106 (9). - P. 3366-3371.
537. van Riel, D. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract / D. van Riel, V.J. Munster, E. de Wit et al. // *Science*. - 2006. - 312 (5772). - P. 399.
538. Vesikari, T. A randomized, double-blind study of the safety, transmissibility and phenotypic and genotypic stability of cold-adapted influenza virus vaccine / T. Vesikari, A. Karvonen, T. Korhonen // *Ped. Inf. Dis. J.* - 2006.- 25 (7). - P. 590-595.
539. Vines, A. The Role of Influenza A Virus Hemagglutinin Residues 226 and 228 in Receptor Specificity and Host Range Restriction / A.Vines, K. Wells, M. Matrosovich et al. // *J Virol.* - 1998. - 72 (9). - P. 7626-7631.
540. Wagner, R. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections / R. Wagner, M. Matrosovich, H.D. Klenk // *Rev Med Virol.* - 2002. - 12 (3). - P. 159-66.
541. Wang, C. Novel human H7N9 influenza virus in China / C. Wang, J. Luo, J. Wang et al. // *Integr Zool.* - 2014. - 9 (3). - P. 372-375.
542. Wang, G. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health / G. Wang, G. Deng, J. Shi et al. // *J Virol.* - 2014. - 88 (8). - P.3953-3964.
543. Wang, Q. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, X. Tian, X. Chen, J. Ma // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2007. - 104 (43). - P.16874-16879.
544. Wang, Q. Influenza type B virus haemagglutinin: antigenicity, receptor binding and membrane fusion / Q. Wang // In: *Influenza: molecular biology*. - Ed.: Q. Wang, Y.J. Tao, UK: Caister Acad. Press, 2010. - 197 p.
545. Wang, T.T. Emergence and evolution of the 1918, 1957, 1968, and 2009 pandemic virus strains / T.T. Wang, P. Palese, R.G. Webster et al. // P. 218-228. In: *Textbook of influenza*. - Ed.: R.G. Webster, A.S. Monto, T.J. Braciale, R.A. Lamb. - UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
546. Wang, Y.F. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features / Y.F. Wang, C.F. Chang, C.Y. Chi et al. // *J Med Virol.* - 2012. - 84 (4). - P. 679-685.

547. Wareing, M. D. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review / M.D. Wareing, G.A. Tannock // *Vaccine*. - 2001. - 19 (25-26). - P. 3320-3330.
548. Wareing, M.D. Preparation and characterization of attenuated cold-adapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain / M.D. Wareing, G.A. Marsh, G.A. Tannock // *Vaccine*. - 2002. - 20. - P. 2082-2090.
549. Watanabe, T. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets / T. Watanabe, S. Watanabe, K. Shinya et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2009. - 106 (2). - P.588-592.
550. Watanabe, T. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential / T.Watanabe, G. Zhong, C.A. Russell et al. // *Cell Host Microbe*. - 2014. - 15 (6). - P. 692-705.
551. Webby, R.J. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines / R.J. Webby, D.R. Perez, J.S. Coleman et al. // *Lancet*. - 2004. - 363 - P. 1099-1103.
552. Webby, R. Influenza in swine / R. Webby, J. Richt, R.G Webster et al. // P. 190-202. In: *Textbook of influenza*. - Ed.: R.G. Webster, A.S. Monto, T.J. Braciale, R.A. Lamb. - UK: Wiley Blackwell, 2nd edition, 2013. - 502 p.
553. Webster, R.G. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin / R.G. Webster, R. Rott // *Cell*. - 1987. - 50 (5). - P. 665-666.
554. Webster, R. Evolution and ecology of influenza A viruses / R. Webster, W. Bean, O. Gorman et al. // *Microbiol Rev*. - 1992. - 56 (1). - P. 152-179.
555. Webster, R.G. Influenza: an emerging disease / R.G. Webster // *Emerg. Infect. Dis*. - 1998. - 4 (3). - P. 436-441.
556. Webster, R.G. H5N1 outbreaks and enzootic influenza / R.G. Webster, M. Peiris, H. Chen, Y. Guan // *Emerg Infect Dis*. - 2006. - 12 (1). - P. 3-8.
557. Webster, R.G. Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses / R.G. Webster, D.J. Hulse-Post, K.M. Sturm-Ramirez et al. // *Avian Dis*. - 2007. - 51 (1) Suppl. - P. 269-272.
558. Wey, C.J. Cross-neutralisation of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design / C.J. Wey, R. Boyington, K. Day et al. // *Sci Transl Med*. - 2010. - 2(24). - P. 24ra21.
559. Whitaker-Dowling, P. Dominant-negative mutants as antiviral agents: simultaneous infection with the cold-adapted live-virus vaccine for influenza A protects ferrets from disease produced by wild-type influenza A / P. Whitaker-Dowling, H.F. Maassab, J.S. Younger // *J. Infect. Dis*. - 1991. - 164 (6). - P. 1200 -1202.

560. WHO Global Influenza Surveillance Network: manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [Электронный ресурс] // 2002. - Режим доступа: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>
561. WHO position paper [Электронный ресурс] // 2005. - Режим доступа: <http://www.who.int/wer/2005/wer8033.pdf>.
562. WHO global influenza preparedness plan [Электронный ресурс] // 2005. - Режим доступа: http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf.
563. WHO. Options for live attenuated influenza vaccines (LAIV) in the control of epidemic and pandemic influenza [Электронный ресурс] // Geneva, 12-13 June. - 2007. - Режим доступа: www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html.
564. WHO. The WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. Technical report series. - 2007. - 941 (Annex 5). - P. 267-292.
565. WHO. Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply: progress report 2008 (WHO/IVB/09/05). Influenza [Электронный ресурс] // 2008. - Режим доступа: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_IVB_09.05_eng.pdf.
566. WHO. Influenza (seasonal). Fact sheet No. 211. [Электронный ресурс] // Geneva, - 2009. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
567. WHO. Clinical features of severe cases of pandemic influenza. Geneva, Switzerland. [Электронный ресурс] // 16.10.2009. Archived from the original on 25 October 2009. - Режим доступа: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_clinical_features_20091016/en/.
568. WHO. Pandemic (H1N1) 2009—update 92. 2009. [Электронный ресурс] // 19.03.2010. - Режим доступа: http://www.who.int/csr/don/2010_03_19/en/index.html.
569. WHO. Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza (2010). "Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection" // The New Eng. J. Medicine. - 2010. - 362 (18): 1708-1719.
570. WHO expert committee on biological standardization. Sixtieth report. Annex 4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration [Электронный ресурс] // Technical report series. - 2013. - 977. - P. 153-227. - Режим доступа: http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/influenza/TRS_977_Annex_4.pdf.
571. WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season // Wkly. Epidemiol. Rec. - 2013. - 88. - P. 101-114.

572. WHO. Influenza (Seasonal) [Электронный ресурс] // 2014. - 211. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
573. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness [Электронный ресурс] // Sept. 2015. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201509_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1.
574. WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO [Электронный ресурс] // 2016. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/.
575. WHO. Influenza at the human-animal interface [Электронный ресурс] // 2016. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_H_A_interface_05_09_2016.pdf.
576. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017 southern hemisphere influenza season [Электронный ресурс] // September 2016. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201609_recommendation.pdf?ua=1
577. WHO. FluNet Summary [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/.
578. WHO. Influenza updates [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/.
579. WHO. Recommendations on the composition of influenza virus vaccines [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/index.html>.
580. WHO. Characteristics of the emergent influenza A (H1N1) viruses and recommendations for vaccine development [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/vaccine_recommendations/en/index.html.
581. Widjaja, L. Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses / L. Widjaja, S. L. Krauss, R.J Webby et al. // J Virol. - 2004. - 78 (16). - P. 8771-8779.
582. Wiley, D.C. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus / D.C. Wiley, J.J Skehel // Annu Rev Biochem. - 1987. - 56. - P. 365-94.
583. Wilks, S. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties / S. Wilks, M. de Graaf, D.J. Smith, D.F. // Vaccine. - 2012. - 30 (29). - P. 4369-4376.
584. Wilson, I.A. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3E resolution / I.A. Wilson, J.J. Skehel, D.C. Wiley // Nature. - 1981. - 289 (5796). - P.366-73.

585. Wise, H.M. Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2 / H.M. Wise, C. Barbezange, B.W. Jagger et al. // *Nucleic Acids Res.* - 2011. - 39 (17). - P. 7775-7790.
586. Wise, H.M. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain / H.M. Wise, E.C. Hutchinson, B.W. Jagger et al. // *PLOS Pathogens.* - 2012. - 8 (11). - P.1-14.
587. Wood, J.M. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines / J.M. Wood // *Vaccine.* - 2002. - 20 (Suppl 5). - P. 4-40.
588. Wright, P.F. Trials of influenza A/New Jersey/76 virus vaccine in normal children: an overview of age-related antigenicity and reactogenicity / P.F. Wright, J. Thompson, W.K. Vaughn et al. // *J Infect Dis.* - 1977. - 136 (Suppl: S7). - P. 731-741.
589. Wright, P.F. Cold-adapted recombinant influenza A virus vaccines in seronegative young children / P.F. Wright, N.Okabe, K.T. McKee et al. // *J Infect Dis.* - 1982. - 146 (1). - P. 71-79.
590. Wright, P.F. Live attenuated influenza vaccines / P.F. Wright, D.T. Karzon // *Prog. Med. Virol.* - 1987. - 34. - P.70-88.
591. Wright, P.F. Orthomyxoviruses / P.F. Wright, G. Neumann, Y. Kawaoka et al. // *Fields Virology.* - 2007. - P. 1691-1740.
592. Xu, X. Genetic and antigenic analysis of influenza A (H1N1) viruses, 1986-1991 / X. Xu, E.P. Rocha, H.L. Regnery et al. // *Virus Res.* - 1993. - 28 (1). - P.37-55.
593. Xu, X. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses / X. Xu, S.E. Lindstrom, M.W. Shaw et al. // *Virus Res.* - 2004. - 103 (1-2). P. 55-60.
594. Yamada, S. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors / S. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki et al. // *Nature.* - 2006. - 444 (7117). -P. 378–382.
595. Yamane, N. Isolation of three different influenza A viruses from an individual after probable double infection with H3N2 and H1N1 viruses / N. Yamane, J. Arikawa, T. Odigiri // *Jpn J Med Sci Biol.* - 1978. - 31 (5-6). - P. 431-434.
596. Yamaoka, M. Prevalence of antibody to influenza C virus among pigs in Hyogo prefecture Japan / M. Yamaoka, H. Hotta, M. Itoh, M. Homma // *J Gen Virol.* - 1991. - 72 (Pt 3). - P. 711-714.
597. Yamashita, M. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses / M. Yamashita, M. Krystal, W.M. Fitch, P. Palese // *Virology.* - 1988. - 163 (1). - P. 112-122.

598. Yang, C.-W. Uncovering the potential pan proteomes encoded by genomic strand RNAs of influenza A viruses [Электронный ресурс] / C.-W. Yang, M.-F. Chen // PLoS One. - 2016. - 11 (1). - Режим доступа: DOI:10.1371/journal.pone.0146936.
599. Yanguéz, E. Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor IF4E for viral mRNA translation / E. Yanguéz, P. Rodríguez, I. Goodfellow, A. Nieto // Virology. - 2011. - 422 (2). - P. 297-307.
600. Yasuda, J. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix / J. Yasuda, S. Nakada, A. Kato et al. // Virology. - 1993. - 196 (1). - P. 249-255.
601. Yen, H.L. Hemagglutinin-neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets / H.L. Yen, C.H. Liang, C.Y. Wu et al. // Proc Natl Acad Sci USA. - 2011. - 108 (34). - P. 14264-14269.
602. Yewdell, J. Influenza virus still surprises / Yewdell J., Garcia-Sastre A. // Curr Opin Microbiol. - 2002. - 5 (4). - P. 414-418.
603. Yoon, S.W. Evolution and ecology of influenza A viruses / S.W. Yoon, R.J. Webby, R.G. Webster // Curr Top Microbiol Immunol. - 2014. - 385. - P. 359-375.
604. Youil, R. Phenotypic and genetic analyses of the heterogeneous population present in the cold-adapted master donor strain: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) / R. Youil, I. Kiseleva, W.-S. Kwan et al. // Virus Research. - 2004. - 102. - P. 165-176.
605. Younger, J.S. Effect of simultaneous administration of cold-adapted and wild-type influenza A viruses on experimental wild type influenza in humans / J.S. Younger, J.J. Treanor, P. Whitaker-Dowling et al. // J Clinical Microbiol. - 1994. - 32 (3). - P. 750 - 754.
606. Yu, X. Influenza H7N9 and H9N2 viruses: coexistence in poultry linked to human H7N9 infection and genome characteristics / X. Yu, T. Jin, Y. Cui et al. // J Virol. - 2014. - 88 (6). - P. 3423-3431.
607. Yuan, J. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A(H6N1) virus causing human infection in Taiwan / J. Yuan, L. Zhang, X. Kan et al. // Clin Infect Dis. - 2013. - 57 (9). - P.1367-1368.
608. Zakstelskaja, L.Ja. Influenza in the USSR in 1977: recurrence of influenza virus A subtype H1N1 / L.Ja. Zakstelskaja, M.A. Yakhno, V.A. Isačenko // Bull WHO. - 1978. - 56 (6). - P. 919-922.
609. Zamarin, D. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1 / D. Zamarin, A. Garcia-Sastre, X. Xiao et al. // PLoS Pathog. - 2005. - 1 (1). - P. 0040-0054.
610. Zambon, M.C. The pathogenesis of influenza in humans / M.C. Zambon // Medical Virology. - 2001. - 11 (4). - 227-241.

611. ZDOCK [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.belozersky.msu.ru/spdbv>.
612. Zhang Q., Shi J., Deng G. et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet / Q. Zhang, J. Shi, G. Deng et al. // *Science*. - 2013. - 341 (6144). - P. 410-414.
613. Zhang, T. Human infection with influenza virus A(H10N8) from live poultry markets, China, 2014 [Электронный ресурс] / T. Zhang, Y. Bi, H. Tian et al. // *CDC. Emerging of Infectious Diseases*. - 2014. - 20 (12) - Режим доступа: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/12/14-0911_article.
614. Zhang, Y. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet / Y. Zhang, Q. Zhang, H. Kong et al. // *Science*. - 2013. - 340 (6139). - P.:1459-1463.
615. Zheng, D. Development of live-attenuated influenza vaccines against outbreaks of H5N1 influenza / D. Zheng, Y. Yinglei, Z. Chen et al. // *Viruses*. - 2012. - 4 (12). - P. 3589-3605.
616. Zhou, N.N. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs / N.N. Zhou, D.A. Senne, J.S. Landgraf et al. // *J Virol*. - 1999. - 73 (10). - P. 8851-8856.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

ПЕРЕЧЕНЬ ТАБЛИЦ:

1.1	Сравнительная характеристика вирусов гриппа родов А, В и С	17
1.2	Сегменты РНК вирусов гриппа А и В и кодируемые ими белки	24
2.1	Характеристика эпидемических по гриппу сезонов и состав противогриппозных вакцин	44
3.1	Лицензированные вакцины для профилактики сезонного гриппа	65
3.2	Мутации в генах, кодирующих внутренние белки лицензированных и экспериментальных доноров аттенуации	71
3.3	Потенциальные возбудители пандемий будущего	75
4.1	Параметры оценки температурочувствительности (<i>ts</i> фенотип) и холодоадаптированности (<i>ca</i> фенотип) вирусов гриппа в опытах на РКЭ	79
5.1	Роль мутантных генов в формировании температурочувствительного фенотипа реассортантов донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и «дикого» вируса А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)	93
5.2	Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа А и их <i>ts</i> фенотипом	95
5.3	Репродукция донора аттенуации В/СССР/60/69 и его субклонов в развивающихся куриных эмбрионах при разных температурах инкубации	96
5.4	Различия в аминокислотной последовательности белка РВ1 клонов донора аттенуации В/СССР/60/69, отличающихся по температурочувствительности репродукции в куриных эмбрионах при 37°C	98
5.5	Определение в РКЭ инфекционного титра донора аттенуации В/СССР/60/69 и его клонов в носовых смывах иммунизированных морских свинок	99
5.6	Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и их <i>ts</i> фенотипом	103
5.7	Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и их <i>ts</i> фенотипом (сводная таблица)	104
5.8	Корреляция между составом генома реассортантных вирусов гриппа В и их <i>ca</i> фенотипом	105
5.9	Приблизительное число нуклеотидных и аминокислотных различий между «диким» вирусом В/СССР/69 и донором аттенуации В/СССР/60/69. Данные получены в сотрудничестве с компанией Merck & Co., Inc. (США)	106
5.10	Эволюция признака чувствительности к температуре инкубации в РКЭ от предполагаемого предшественника и известного промежуточного варианта к донору аттенуации В/СССР/60/69	107
5.11	Уникальные аминокислотные замены во внутренних белках донора аттенуации <i>ca/ts</i> В/СССР/60/69/525 в сравнении с <i>non-ca/ts</i> В/СССР/17/69, отстоящим на 17 пассажей от утраченного родительского вируса, и эпидемическими вирусами гриппа В	109
5.12	Аминокислотные различия в негликозилированных белках <i>ts/non-ca</i> вируса В/СССР/17/69 и клонов из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69, различающихся по степени температурочувствительности	110
6.1	Характеристика температурочувствительности эпидемических штаммов вируса гриппа А в развивающихся куриных эмбрионах при температурах инкубации превышающих оптимальные значения	120
6.2	Эволюция температуроустойчивости репродукции в развивающихся куриных	123

	эмбрионах вирусов гриппа В	
6.3	Температурочувствительность репродукции в куриных эмбрионах вирусов гриппа А(Н3N2), изолированных в один эпидемический сезон 1976 года в Ленинграде	125
6.4	Температурочувствительность репродукции в куриных эмбрионах вирусов гриппа А(Н3N2), изолированных в один эпидемический сезон 1979/80 года в Москве, Риге и в Германии	126
6.5	Характеристика вирусов гриппа А(Н1N1), изолированных в эпидемические сезоны 1979/80 и 1981/82 годов в Москве, по признаку устойчивости репродукции при повышенных температурах в куриных эмбрионах	127
6.6	Характеристика вирусов гриппа А (Н1N1 и Н3N2), выделенных в течение двух эпидемий 1998 и 2000 годов в Санкт-Петербурге, по признаку устойчивости репродукции при повышенных температурах в РКЭ	128
6.7	Характеристика температуро- и ингибиторочувствительности В/Пекин/184/93-подобных вирусов, выделенных в эпидемию 1995-1996 года в России (Санкт-Петербург) и в США	129
6.8	Характеристика различий по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при температурах за пределами оптимальных у представителей эпидемических вирусов гриппа А и В (сводные данные по таблицам Б.2-Б.5 и 7.2-7.4)	131
6.9	Активность неспецифических ингибиторов нормальной сыворотки крови лошади при разных вариантах ее температурной обработки	134
6.10	Чувствительность вирусов гриппа А неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади	136
6.11	Чувствительность вирусов гриппа В к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади	137
6.12	Чувствительность к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади антигенно родственных изолятов вирусов гриппа А и В из отдельных эпидемий	138
6.13	Аминокислотные замены в гемагглютинине дивергентных линий вирусов гриппа В	141
6.14	Чувствительность родительских вирусов гриппа и реассортантов к неиммунной сыворотке крови морской свинки в реакции торможения гемагглютинации	144
7.1	Реассортантные вакцинные штаммы, подготовленные для сезонных, пандемической и потенциально пандемических аттенуированных ЖГВ с 1995 по 2015 гг.	147
7.2	Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа А (Н1N1), донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе	151
7.3	Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа А (Н3N2), донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе	152
7.4	Биологические характеристики в системе РКЭ эпидемических штаммов вируса гриппа В, донора аттенуации и вакцинных реассортантов, полученных на их основе	153
7.5	Рестрикционный анализ участков РВ1 и NS генов эпидемических вирусов гриппа А разных лет выделения (по данным GeneBank)	159
7.6	Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) и вакцинных штаммов до и после пятикратного пассирования в РКЭ при 32°С (по данным ПЦР-рестрикционного анализа)	163

7.7	Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации В/СССР/60/69/525 и вакцинных штаммов до и после пятикратного пассирования в РКЭ при 32°C (по данным частичного секвенирования фрагментов генома)	164
7.8	Температурочувствительность и холодоадаптированность вакцинных штаммов вируса гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) до и после их пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при разрешающих температурах	164
7.9	Температурочувствительность и холодоадаптированность вакцинного штамма вируса гриппа В и донора аттенуации В/СССР/60/69 до и после их пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при разрешающих температурах	165
7.10	Характеристика репродукции доноров аттенуации А и В и реассортантных штаммов ЖГВ на их основе в процессе пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при непермиссивных температурах	165
7.11	Изучение патогенности вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В после внутрибрюшинного (в/бр), подкожного (п/к) и интраназального (и/н) введения мышам и морским свинкам	166
7.12	Выделение штаммов живой гриппозной вакцины из носовых мазков в РКЭ и культуре клеток MDCK на 2–4 дни после вакцинации детей 3–6 лет	168
7.13	Результаты типирования штаммов выделенных от привитых живой гриппозной вакциной детей 3–6 лет, на 2–4 дни после вакцинации в РКЭ и культуре клеток MDCK	169
7.14	Чувствительность вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови	173
7.15	Прирост инфекционного титра вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) при накоплении в развивающихся куриных эмбрионах в течение 48 и 72 часов при 32°C	173
7.16	Фенотипические свойства вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm до и после его пассирования в куриных эмбрионах	173
7.17	Результаты выделения пандемического штамма А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) и вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm из верхних дыхательных путей хорьков	175
7.18	Результаты выделения пандемического штамма А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) и вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm из внутренних органов хорьков	176
7.19	Иммунный ответ хорьков на введение вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm через 15 дней после заражения	176
7.20	Чувствительность вирусов гриппа к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови животных в РТГА с куриными эритроцитами ...	179
7.21	Фенотипический анализ вакцинного штамма А/17/Индиана/11/72 (H3N2v) в РКЭ	180
7.22	Результаты изучения безвредности вакцинного штамма А/17/Индиана/2011/72 (H3N2v) в экспериментах на морских свинках	182
7.23	Состав генома вакцинных реассортантов H5N2, полученных в развивающихся куриных эмбрионах	184
7.24	Результаты классической реассортации в куриных эмбрионах вирусов VN-PR и INDO-PR (H5N1) с донором аттенуации А17	185
7.25	Получение реассортантов между NIBRG–23 и донором аттенуации А17 (Реактивация в РКЭ. Двухэтапное крещивание).....	187
7.26	Фенотипический анализ вакцинных реассортантов с формулой генома 7:1 на основе штаммов А/H5N1/RG-PR8 при репродукции в развивающихся	188

	куриных эмбрионах	
7.27	Нуклеотидные и аминокислотные различия между предшественником донора аттенуации А/Ленинград/134/57(H2N2), донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2) и вакцинными штаммами H5-ЖГВ	189
7.28	Оценка безвредности и инфекционной активности ЖГВ H5N2 при интраназальном введении курам	192
7.29	Проявления аттенуированного фенотипа ЖГВ H5N2 в экспериментах на хорьках после интраназального введения	192
7.30	Иммуногенность H5N2 ЖГВ в исследованиях на хорьках	194
7.31	Выделение высокопатогенных вирусов гриппа птиц из респираторного тракта иммунизированных H5-ЖГВ хорьков после челленджа соответствующим HPAI вирусом H5N1	195
7.32	Мутации в молекуле гемагглютинина изолятов от привитых лиц и клонов вакцинного вируса H5-ЖГВ, полученных после клонирования препарата H5-ЖГВ	198
7.33	Характеристика репродукции изолятов H5N2 при разных температурах инкубации в развивающихся куриных эмбрионах	200
7.34	Принадлежность генов NA и PB2 у реассортантов, полученных при скрещивании донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) со штаммами для инактивированной гриппозной вакцины	203
7.35	Характеристика репродуктивной активности клонов из популяции эпидемических вирусов гриппа В в РКЭ	206
7.36	Влияние ингибиторочувствительности эпидемических вирусов гриппа на включение их нейраминидазы в состав реассортантов при скрещивании с донорами аттенуации	208
7.37	Отличия последовательностей гемагглютинина и нейраминидазы у одногенных (7:1) реассортантов вирусов гриппа	210
8.1	Роль аминокислотных замен в белках доноров аттенуации для российской (Ультравак [®]) и американской (FluMist [®]) ЖГВ в проявлении <i>ts</i> фенотипа	216
Б.1	Список вирусов гриппа использованных в работе	304
Б.2	Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RCT ₄₀)	308
Б.3	Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H2N2) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RCT ₄₀)	310
Б.4	Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RCT ₄₀)	311
Б.5	Фенотипические свойства вирусов гриппа В, изолированных в различные годы (чувствительность к повышению температуры инкубации в куриных эмбрионах, чувствительность к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади)	313
В.1	Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для определения методом RFLP-анализа состава генома штаммов, подготовленных при скрещивании донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с современными эпидемическими штаммами вируса гриппа А (H1N1) или А (H3N2)	316
В.2	Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для определения методом RFLP-анализа состава генома штаммов, подготовленных при скрещивании донора аттенуации В/СССР/60/69 с современными эпидемическими штаммами вируса гриппа В,	317

	принадлежащими «Викторианской» ветви или ветви «Ямагата»	
V.3	Программы, используемые для ПЦР–анализа состава генома реассортантов, полученных при скрещивании доноров аттенуации и «диких» вирусов	318
V.4	Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа А (H1N1) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	319
V.5	Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа А (H3N2) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	320
V.6	Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа В с донором аттенуации В/СССР/60/69	321
V.7	Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР реассортантов, полученных при скрещивании штаммов подобных пандемическому вирусу А/Калифорния/07/09 (H1N1), с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	322
V.8	Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании штаммов для инактивированной гриппозной вакцины, подготовленных на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А (H5N1) и вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	323
V.9	Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для анализа состава генома и сохранности мутаций, специфичных для донора аттенуации штаммов вируса гриппа А	324
V.10	Сиквенс нуклеотидных и аминокислотных последовательностей чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69/525	325
V.11	Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 86 аминокислотная позиция)	333
V.12	Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 163 аминокислотная позиция)	334
V.13	Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 224 аминокислотная позиция)	335

ПЕРЕЧЕНЬ РИСУНКОВ:

1.1	(А) Структура вируса гриппа А. (Б) Цикл репродукции в инфицированной клетке. (В) вРНП	21
2.1	Резервуары низкопатогенных вирусов птичьего гриппа и события их межвидовой трансмиссии	32
2.3	Пандемии гриппа 20-го – начала 21-го века	38
2.4	Происхождение генов пандемических вирусов гриппа. А) – H1N1(1918) pdm, H2N2(1957) pdm, H3N2(1968) pdm; Б) – H1N1(2009) pdm	40
4.1	Схема получения штаммов живой гриппозной реассортантной вакцины	80
5.1	Фенотипические особенности донора аттенуации В/СССР/60/69 и клонов из его гетерогенной популяции	97
5.2	Гуморальный иммунный ответ морских свинок на интраназальное введение неклонированного донора В/СССР/60/69 и двух его клонов через 3 недели после заражения	100

6.1	Эволюция вирусов гриппа А (H1N1) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах	115
6.2	Эволюция вирусов гриппа А (H2N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах	116
6.3	Эволюция вирусов гриппа А (H3N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах	119
6.4	Эволюция вирусов гриппа В по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах	123
6.5	Аминокислотные позиции в белке НА, соответствующие проявлению признака ингибиторочувствительности у вирусов гриппа В	140
7.1	Репродуктивная способность эпидемических вирусов гриппа А (а) и В (б) и реассортантных штаммов ЖГВ на их основе в развивающихся куриных эмбрионах	155
7.2	Репродукция вакцинных реассортантов вирусов гриппа А (а) и В (б) и доноров аттенуации в развивающихся куриных эмбрионах при различной множественности инфекции	156
7.3	Пример анализа методом «да-нет»-ПЦР принадлежности гена РА у реассортантов из скрещивания эпидемического вируса А/Виктория/361/2011 (H3N2) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	162
7.4	Пример анализа методом «да-нет»-ПЦР принадлежности гена НА у реассортантов из скрещивания эпидемического вируса В/Висконсин/1/2010 с донором аттенуации В/СССР/60/69/525	162
7.5	Репродуктивность и иммуногенность вакцинных штаммов, входящих в состав трехвалентной живой гриппозной реассортантной вакцины, в наблюдениях на детях 3-6 лет	170
7.6	Определение принадлежности полимеразных генов реассортантного вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm методом RFLP-анализа	174
7.7	Анализ состава генома реассортантного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm. Электрофорез мультиплекс ПЦР (в варианте «да-нет»)	176
7.8	Динамика изменения температуры тела хорьков, зараженных интраназально пандемическим штаммом А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) и пандемической вакциной из штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm	177
7.9	Динамика изменения А) веса тела хорьков и Б) температуры тела хорьков, вакцинированных ЖГВ H5N2	193
7.10	Динамика изменения А) веса тела хорьков и Б) температуры тела хорьков, иммунизированных ЖГВ H5N2, после челленджа летальной дозой HPAIV H5N1	196
7.11	Локализация аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина клинических изолятов, полученных от волонтеров, вакцинированных H5-ЖГВ	198

ПРИЛОЖЕНИЕ А

МИКРОГЕН

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-производственное объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России
в г. Иркутск «Иркутское предприятие по производству
бактерийных препаратов»

ОГРН 1037722027727, ИНН 7722292838, КПП 381102001, ОКПО 01898724, ОКВЭД 24.41.

Место нахождения и почтовый адрес:
ул. 3-я Легчиков, д. 1А, г. Иркутск, 664009.
Тел. (3952)27-12-31, факс (3952)27-12-29,
e-mail: info.irkutsk@microgen.ru

12.02.2016 № 57

на

[об использовании вакцинных штаммов]

За большой период работы, начиная с 1998 г. и, по настоящее время, сотрудниками лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций Института Экспериментальной Медицины (ФГБУ «ИЭМ») и Иркутским филиалом ФГУП «НПО»Микроген» были изучены кандидаты вакцинных штаммов, подготовленные из реассортантных штаммов вирусов гриппа для дальнейшего использования их в производстве сезонных гриппозных вакцин (список вакцинных штаммов прилагается).

Иркутский филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России - единственное в России предприятие, выпускающее живые гриппозные вакцины. Рождению вакцинного штамма предшествует большая работа: подбор оптимальных условий культивирования вируса гриппа, выбор штамма-реассортанта для аттенуации, выбор из кандидатных штаммов - вакцинного.

Н.В. Ларионова – сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций ФГБУ «ИЭМ» принимает непосредственное участие в этой работе. Она активно занимается изучением реассортантных штаммов, наработкой материала с целью передачи качественных производственных штаммов на производство.

Кроме того, Н.В.Ларионова проводит консультативную работу по подбору оптимальных условий культивирования вирусов гриппа, которые отрабатываются в экспериментах в лаборатории, что позволяет при начале производственного процесса избежать дополнительных потерь выхода аллантоисной жидкости с 1 куриного эмбриона. При её участии разработано несколько десятков вакцинных штаммов, включая пандемические. Так, в 2009 г. подготовлен пандемический штамм А/17/Калифорния/2009/38(Н1N1). На базе этого штамма в 2009 г. Иркутским филиалом ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России выпущена пандемическая живая гриппозная вакцина.

Все вакцинные штаммы проходят испытания в Испытательном центре экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов (ИЦ МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Директор филиала



С.И. Брызгалова

СПИСОК АТТЕНУИРОВАННЫХ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСОВ
ГРИППА, ПОДГОТОВЛЕННЫХ СОТРУДНИКАМИ ФГБНУ «НИИ ИЭМ»
ЛАРИОНОВОЙ Н.В. И СОАВТОРАМИ,
НА ОСНОВЕ КОТОРЫХ ИРКУТСКИМ ФИЛИАЛОМ НПО «МИКРОГЕН»
ПРОИЗВОДИЛАСЬ ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА В ПЕРИОД 1995–20015 ГГ.

1. Штамм **A/17/Иоганнесбург/94/1 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых / Ю.Р. Романова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова.
2. Штамм **A/17/Нанчанг/95/4 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, Н.В. Ларионова.
3. Штамм **A/47/Нанчанг/95/13 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для детей / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, И.В.Киселева.
4. Штамм **B/60/Петербург/95/20** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей/ И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г.Руденко.
5. Штамм вируса гриппа **B/60/Иоханнесбург/99/50** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Ю.А. Дешева, Н.В. Ларионова, А.И.Климов.
6. Штамм вируса гриппа **A/17/Вайоминг/03/8(H3N2)**для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей / И.В.Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова.
7. Штамм вируса гриппа **B/60/Джиллин/03/1** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова, Н.В. Ларионова, А.Н.Климов.
8. Штамм вируса гриппа **B/60/Малайзия/04/898** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова.
9. Штамм вируса гриппа **B/60/Флорида/04/181** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Н.В.Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко.
10. Штамм вируса гриппа для **A/17/Соломоновы острова/06/9 (H1N1)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей.

11. Штамм вируса гриппа для **A/17/Брисбен/07/28 (H1N1)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / И.В. Киселева, Н.В.Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко.
12. Штамм вируса гриппа для **A/17/Брисбен/07/1 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / И.В.Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко.
13. Штамм вируса гриппа **B/60/Брисбен/08/83** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Н.В.Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко.
14. Вакцинный штамм вируса гриппа **A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Н.В.Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова.
15. Вакцинный штамм вируса гриппа **B/60/Висконсин/2010/125** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.А. Дубровина, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова.
16. Вакцинный штамм вируса гриппа **A/17/Виктория/2011/89 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей / Н.В.Ларионова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко.
17. Вакцинный штамм вируса гриппа **A/17/Техас/2012/30 (H3N2)** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / И.А. Дубровина, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова.
18. Вакцинный штамм вируса гриппа **B/60/Массачусетс/2012/10** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова.
19. Вакцинный штамм вируса гриппа **B/60/Пхукет/2013/26** для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / И.В. Киселева, Е.В. Крутикова, И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Л.Г. Руденко.





**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ
ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)
РУКОВОДИТЕЛЬ**

Березковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Тел/факс 240-65-79

25.05.2011 № 01/37-292/41

На № _____ от _____

НИИЭМ СЗО РАМН,
НОО-отдел

ул. Академика Павлова, 12,
Санкт-Петербург, 197376

Уважаемые Патентообладатели!

Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам награждает Вас дипломом Роспатента в связи с включением Вашего изобретения «Вакцинный штамм вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей» (патент Российской Федерации № 2413765) в список «100 лучших изобретений России» за 2010 год.

Поздравляю Вас и желаю дальнейших творческих успехов!

Приложение: диплом Роспатента на 1 л. в 1 экз.

С уважением,

Б.П. СИМОНОВ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ
ЗНАКАМ

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL
PROPERTY, PATENTS
AND TRADEMARKS



НАГРАЖДАЕТСЯ

В номинации «100 лучших изобретений России»

*Патентообладатель(и): Учреждение Российской Академии
медицинских наук Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН*

*Автор(ы): Ларионова Наталья Валентиновна, Киселева Ирина Васильевна,
Руденко Лариса Георгиевна, Александрова Галина Ибрагимовна
за разработку «ВАКЦИННЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА А/17/КАЛИФОРНИЯ/
2009/38 (H1N1) ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ
ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ВЗРОСЛЫХ И ДЛЯ ДЕТЕЙ»
(патент Российской Федерации № 2413765)*

Руководитель

Б.П. Симонов



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 - Список вирусов гриппа использованных в работе

<i>Вирусы гриппа А (H1N1)</i>		
<i>Эталонные вирусы и их прототипы</i>	<i>Изоляты из эпидемий</i>	<i>Эталон</i>
A/Wilson-Smith/33	A/Ленинград/322/77	A/СССР/90/77
A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34)	A/Хабаровск/34457/77	
A/FM1/47	A/Хабаровск/34572/77	
A/СССР/90/77	A/Хабаровск/34574/77	
A/Бразилия/11/78 (H1N1)	A/Ленинград/322/79	A/Бразилия/11/78
A/Калифорния/10/78	A/Москва/1366/79	
A/Англия/333/80	A/Москва/2175/79	
A/Тайвань/1/86	A/Москва/45/81	A/Англия/333/80
A/Ленинград/92/89	A/Москва/46/81	
A/Техас/36/91	A/Москва/9058/81	
A/Берн/7/95	A/Москва/9085/82	
A/Пекин/262/95	A/Ленинград/315/84	
A/Перт/13/95	A/Одесса/1182/84	Межэпидемические изоляты
A/Иоганнесбург/82/96	A/Свердловск/211/85	
A/Новая Каледония/20/99	A/Новошахтинск/3/86	
A/Соломоновы острова/3/06	A/Новошахтинск/8/86	
A/Гонконг/2652/06	A/Ленинград/337/88	
A/Санкт-Петербург/8/06	A/Свердловск/277/89	
A/Брисбен/59/07	A/С-Петербург/14/98	
A/Калифорния/07/09 _{pdm}	A/С-Петербург/35/98	
A/Северная Каролина/39/2009 _{pdm}	A/С-Петербург/73/98	
A/Боливия/559/13	A/С-Петербург/77/98	
	A/С-Петербург/89/98	
	A/С-Петербург/100/98	
	A/С-Петербург/101/98	
	A/С-Петербург/103/98	
	A/Калининград/5/00	
	A/С.-Петербург/11/01	
	A/Астрахань/62/01 _{секц.}	
	A/Астрахань/68/01 _{секц.}	
<i>Вирусы гриппа А (H2N2)</i>		
<i>Эталонные вирусы и их прототипы</i>	<i>Изоляты из эпидемий</i>	
A/Сингапур/1/57	A/Ленинград/61-31/61	
A/Ленинград/134/57	A/Ленинград/3248/61	
A/Краснодар/101/59	A/Ленинград/29/62	
A/Энн Арбор/6/60	A/Ленинград/2/63	
A/Англия/12/64	A/Ленинград/2174/63	
A/Москва/21/65	A/Ленинград/2223/63	
A/Калифорния/1/66	A/Ленинград/3178/67	
A/Токио/3/67	A/Ленинград/3187/67	
<i>Вирусы гриппа А (H3N2)</i>		
<i>Эталонные вирусы и их прототипы</i>	<i>Изоляты из эпидемий</i>	<i>Эталон</i>
A/Гонконг/1/68	A/Ленинград/10/75	A/Виктория/3/75
A/Аичи/2/68	A/Хабаровск/29510/75	

Продолжение таблицы Б.1

А/Виктория/35/72	А/Ленинград/58/76	А/Москва/406/76	
А/Англия/42/72	А/Ленинград/59/76		
А/Порт Чалмерс/1/73	А/Ленинград/62/76		
А/Виктория/3/75	А/Ленинград/64/76		
А/Москва/406/76	А/Ленинград/65/76		
А/Техас/1/77	А/Ленинград/67/76		
А/Бангкок/1/79	А/Ленинград/80/76		
А/Бангкок/2/79	А/Ленинград/81/76		
А/Ленинград/322/79	А/Ленинград/82/76		
А/Филиппины/2/82	А/Ленинград/83/76		
А/Ленинград/234/84	А/Ленинград/84/76		
А/Сычуань/2/87	А/Ленинград/85/76		
А/Закарпатье/354/89	А/Ленинград/128/76		
А/Пуэрто-Рико/11/20/90	А/Ленинград/180/76		
А/Шангдонг/9/93	А/Москва/1662/79		
А/Иоганнесбург/33/94	А/Москва/2146/79		
А/Нанчанг/933/95	А/Москва/28/80	А/Техас/1/77	
А/Сидней/5/97	А/Москва/29/80		
А/Панама/2007/99	А/Москва/1192/79	А/Бангкок/1/79	
А/Москва/10/99	А/Москва/1849/79		
А/Воронеж/511/00	А/Рига/1/79		
А/С.-Петербург/128/00	А/Рига/3/79		
А/Липецк/44/00	А/Рига/4/79		
А/Кумамото/102/02	А/Рига/5/79		
А/Вайоминг/03/03	А/Рига/6/79		
А/Веллингтон/01/04	А/Рига/7/79		
А/Малайзия/01/04	А/Москва/1472/79		
А/КАЛИФОРНИЯ/07/04	А/Грейфсвальд/8/80		
А/Висконсин/67/05	А/Грейфсвальд/9/80		
А/БРИСБЕН/10/07	А/Грейфсвальд/10/80		
А/Перт/16/2009	А/Берлин/5/80		
А/Виктория/361/11	А/Потсдам/9/80		
А/Гавайи/22/12	А/Дрезден/1/80		
А/Техас/50/12	А/Рига/2/79		А/Бангкок/2/79
А/Огайо/02/12	А/С-Петербург/120/00		А/Сидней/5/97
	А/С-Петербург/127/00		
	А/С-Петербург/128/00		
	А/С-Петербург/147/00		
	А/С-Петербург/164/00		
	А/С-Петербург/181/00		
	А/С-Петербург/183/00		
	А/С-Петербург/186/00		
	А/Днепропетровск/2918/87	Межэпидемические изоляты	
	А/Одесса/660/88		
	А/Москва/133/7/89		
	А/Харьков/38/91		
	А/Харьков/38/91		

Продолжение таблицы Б.1

<i>Вирусы гриппа В</i>		
<i>«Ранние» вирусы гриппа В</i>		
В/ЛЕН/40 ¹	В/Россия/69	
В/Ленинград/14/55	В/ГОНКОНГ/5/72	
В/Ленинград /95/59	В/Гонконг/8/73	
В/Энн Арбор/1/66	В/Англия/2668/76	
В/Душанбе/62/66	В/Ленинград/14/3/76	
В/СССР/69		
<i>Вирусы гриппа В линии «Ямагата»</i>		
<i>Эталонные вирусы и их прототипы</i>	<i>Изоляты из эпидемий</i>	<i>Эталон</i>
В/Ямагата/16/88	В/С.-Петербург/184/95	В/Пекин/184/93
В/Пекин/203/89	В/С.-Петербург/185/95	
В/Панама/45/90	В/С.-Петербург/198/95	
В/Пекин/184/93	В/С.-Петербург/202/95	
В/Харбин /7/94	В/С.-Петербург/206/95	
В/С.-Петербург/92/95	В/С.-Петербург/209/95	
В/Яманаш/166/98	В/С.-Петербург/221/95	
В/Сичуань/379/99	В/Айова/03/95	
В/Иоганнесбург/05/99	В/Южная Дакота/04/96	
В/Архангельск/312/99	В/Техас/11/96	
В/Шанхай/72/99	В/Аляска/01/96	
В/Токио/53/99	В/Теннеси/01/96	
В/Оклэнд/1/00	В/Луизиана/01/96	
В/Мехико/84/00	В/Флорида/02/96	
В/Гуандонг/120/00	В/Пенсильвания/02/96	
В/Виктория/504/00	В/Вашингтон/01/96	
В/Улан-Уде/3/01	В/Висконсин/02/96	
В/Шанхай/361/02	В/Висконсин/03/96	
В/Джилин/20/03	В/Висконсин/04/96	
В/Флорида/7/04	В/Висконсин/05/96	
В/Флорида/4/06	В/Нью Йорк/01/96	
В/Висконсин/1/10	В/Висконсин/05/96	
В/Бангладеш/1994/10		
В/Техас/06/11		
В/Массачусеттс/2/12		
<i>Вирусы гриппа В линии «Виктория»</i>		
<i>Эталонные вирусы и их прототипы</i>	<i>Изоляты</i>	
В/СССР/100/83	В/Киев/2186/85	
В/Энн Арбор/1/86	В/Рига/3968/86	
В/Энн Арбор /2/86	В/СССР/2/87 межэпидемический изолят	
В/Виктория/2/87		
В/СССР/3/87		
В/Шандонг/7/97		
В/Тегеран/80/02		
В/Гонконг/330/01		
В/Гавай/10/01		

Продолжение таблицы Б.1

В/Акита/5/02	
В/МАЛАЙЗИЯ/2506/04	
В/Гавайи/13/04	
В/Огайо/1/2005	
В/БРИСБЕН/60/08	
В/Техас/26/08	
В/Брисбен/33/08	
В/Невада/3/11	
В/Техас/02/13	
<i>Потенциально пандемические вирусы гриппа</i>	
А/Индиана/10/2011(Н3N2)v	
А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1) (H5N1) (A/VN/1203/2004)	
А/Вьетнам/1194/2004 (клайд 1) (H5N1)	
А/Индонезия/5/2005 (клайд 2.1) (H5N1) (A/Indo/5/2005)	
А/лебедь-кликун/Монголия /244/2005 (клайд 2.2) (H5N1)	
А/индюк/Турция/01/2005 (клайд 2.2) (H5N1) (A/T/T/1/2005)	
А/горный гусь/Монголия /1/2005 (клайд 2.2) (H5N1)	
А/Аньхой /1/2005 (клайд 2.3) (H5N1)	
<i>RG-реассортанты для инактивированной вакцины на основе донора репродуктивности А/PR/8/34 и генов НА Н5 с укороченным сайтом рестрикции и NA N1 HPAI вирусов</i>	
<i>реассортант</i>	<i>HPAIV, родительский вирус</i>
VN/1203/PR8-IBCDC-RG (H5N1) (VN-PR)	А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1)
INDO/05/PR8-IBCDC-RG (H5N1) (INDO-PR)	А/Индонезия/05/2005 (клайд 2.1)
NIBRG-23 -RG (H5N1) (Turkey-PR)	А/индюк/Турция/1/2005 (клайд 2.2)
<i>Доноры аттенуации для российской ЖГВ</i>	
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	
В/СССР/60/69, клонированный донор att В/СССР/60/69/525	
<i>Штаммы ЖГВ</i>	
Вакцинный штамм В/СССР/17/69, ts/ non-ca предшественник донора att В/СССР/60/69	
А/17/Соломоновы острова/06/9 (H1N1)	В/60/Петербург/95/20
А/17/Гонконг/06/5977 (H1N1)	В/60/Иоганнесбург/99/50
А/17/Брисбен/07/28 (H1N1)	В/60/Шанхай/02/187
А/17/Калифорния/09/38 (H1N1) pdm	В/60/Джилин/03/1
А/17/Иоганнесбург/94/1 (H3N2)	В/60/Малайзия/04/898
А/17/Нанчанг/95/4 (H3N2)	В/60/Флорида/04/181
А/47/Нанчанг/95/13 (H3N2)	В/60/Брисбен/08/83
А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2)	В/60/Висконсин/10/125
А/17/Брисбен/07/1 (H3N2)	В/60/Массачусеттс/12/10
А/17/Виктория/11/89 (H3N2)	
А/17/Техас/12/30 (H3N2)	А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) [39]
А/17/Индиана/11/72 (H3N2)v	А/17/Панама/99/242 (H3N2) [40]
А/17/Вьетнам/04/65107 (H5N2)	
А/17/Индонезия/05/4241(H5N2)	
А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)	
А/17/Вьетнам/1203/04-RG (H5N1)	
Реассортанты между донорами аттенуации А17 или В60/525 и эпидемическими вирусами гриппа с разным набором генов от донора аттенуации	

Таблица Б.2 - Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RСТ₄₀)

Вирус гриппа	RСТ ₄₀ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	Фенотип	Период циркуляции антигенных вариантов эталонного вируса (гг.)
A/Wilson-Smith/33	1,6	<i>non-ts</i>	1933-1956
A/Puerto Rico/8/34	0,6	<i>non-ts</i>	
A/Мельбурн/35 [78] ¹	0,8	<i>non-ts</i>	
A/Билбами/42 [71]	3,2	<i>non-ts</i>	
A/Вейсс/43 [71]	1,1	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/9/46 [71]	2,0	<i>non-ts</i>	
A/FM1/47	0,5	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/3711/49 [105]	2,5	<i>non-ts</i>	
A/Швеция/1/50 [105]	6,3	<i>ts</i>	
A/Ленинград/163/52 [105]	5,0	<i>ts</i>	
A/Англия/1/53 [105]	2,0	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/53/53 [105]	4,5	\pm <i>ts</i>	
A/Нидерланды/1/56 [105]	0,5	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/347/56 [2, 105]	5,5	<i>ts</i>	
A/Ленинград/349/56 [105]	5,8	<i>ts</i>	
В период с 1957 по 1976 годы вирусы А(H1N1) не циркулировали			
A/СССР/90/77 ²	5,0	<i>ts</i>	1977-1980
A/Гонконг/123/77 [196]	0,6	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/322/77	1,0	<i>non-ts</i>	
A/Хабаровск/34457/77	5,0	<i>ts</i>	
A/Хабаровск/34572/77	5,8	<i>ts</i>	
A/Хабаровск/34574/77	5,4	<i>ts</i>	
A/БРАЗИЛИЯ/11/78 ²	8,0	<i>ts</i>	1980-1984
A/КАЛИФОРНИЯ/10/78	7,7	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/322/79	1,0	<i>non-ts</i>	
A/АНГЛИЯ/333/80	8,5	<i>ts</i>	
A/СССР/03/81 [43]	4,0	\pm <i>ts</i>	
A/Киев/271/81 ³ [71]	0,0	<i>non-ts</i>	
A/Киев/277/81 ³ [71]	0,0	<i>non-ts</i>	
A/Ленинград/16/82 [22]	7,5	<i>ts</i>	
A/ДАНЕДИН/27/83*[22]	7,2	<i>ts</i>	
A/Ленинград/10/84 [78]	7,2	<i>ts</i>	
A/ЧИЛИ/1/83*, [22]	7,0	<i>ts</i>	1984-1987
A/Ленинград/125/84 [22]	7,2	<i>ts</i>	
A/Иркутск/674/84 (Чили-like, no is) [22]	7,7	<i>ts</i>	
A/Ленинград/1/84 [43]	6,5	<i>ts</i>	
A/Ленинград/2/84 [43]	8,3	<i>ts</i>	
A/Барнаул/244/84 [22, 78]	6,8	<i>ts</i>	
A/Ленинград/315/84 ⁴	9,0	<i>ts</i>	

Таблица Б.2 - (продолжение)

А/Одесса/1182/84 ⁴	9,0	<i>ts</i>	
А/Свердловск/211/85 ⁴	6,5	<i>ts</i>	
А/Новошахтинск/3/86 ⁴	7,0	<i>ts</i>	
А/Новошахтинск/8/86 ⁴	8,0	<i>ts</i>	
А/ТАЙВАНЬ/1/86	6,5	<i>ts</i>	1987-1991
А/Ленинград/62/86 [35]	7,0	<i>ts</i>	
А/Ленинград/337/88 ⁴	8,0	<i>ts</i>	
А/Свердловск/277/89 ⁴	6,5	<i>ts</i>	
А/Ленинград/92/89	7,0	<i>ts</i>	
А/ТЕХАС/36/91	2,1	<i>non-ts</i>	1991-1996
А/БЕРН/7/95	8,5	<i>ts</i>	1995-2000
А/ПЕКИН/262/95	2,2	<i>non-ts</i>	
А/Перт/13/95	3,0	<i>non-ts</i>	
А/Иоганнесбург/82/96	2,5	<i>non-ts</i>	
А/НОВАЯ КАЛЕДОНИЯ/20/99	2,0	<i>non-ts</i>	2000-2007
А/Калининград/5/00	1,5	<i>non-ts</i>	
А/Санкт-Петербург/11/01	7,5	<i>ts</i>	2001
А/Астрахань/62/01 _{секц.}	5,5	<i>ts</i>	
А/Астрахань/68/01 _{секц.}	6,5	<i>ts</i>	
А/СОЛОМОНОВЫ О-ВА/03/06	8,5	<i>ts</i>	2007-2008
А/Санкт-Петербург/8/06	8,0	<i>ts</i>	
А/Гонконг/2652/06	8,3	<i>ts</i>	
А/БРИСБЕН/59/07	8,5	<i>ts</i>	2008-2009
А/КАЛИФОРНИЯ/07/09 _{pdm}	1,2	<i>non-ts</i>	
А/Боливия/559/13	0,7	<i>non-ts</i>	2009-наст. время

¹Помимо результатов собственных исследований. представлены данные полученные из указанных литературных источников

²Здесь и далее прописными буквами выделены эталонные вирусы;

³штаммы выделения 1981 года по антигенным свойствам и электрофоретической подвижности фрагментов РНК оказались близки возбудителю эпидемии 1952 года А/Ленинград/32/52 (H1N1), отличавшейся тяжестью протекания [71];

⁴межэпидемический изолят.

Таблица Б.3 - Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H2N2) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RСТ₄₀)

Штамм вируса гриппа	RСТ ₄₀ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	<i>ts</i> фенотип
А/СИНГАПУР/1/57	1,8	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/134/57	2,2	<i>non-ts</i>
А/Краснодар/101/59	0,8	<i>non-ts</i>
А/Энн Арбор/6/60	2,3	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/61-31/61	2,5	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/3248/61	2,3	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/29/62	2,2	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/2/63	4,7	<i>ts</i>
А/Ленинград/2174/63	2,7	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/2223/63	5,2	<i>ts</i>
А/Англия/12/64	2,7	<i>non-ts</i>
А/Москва/21/65	6,7	<i>ts</i>
А/Олбани/1/65 [27] ¹	7,2	<i>ts</i>
А/Кумамото/1/65 [27]	7,5	<i>ts</i>
А/Питтсбург/2/65 [27]	6,0	<i>ts</i>
А/Таиланд/394/65 [27]	7,0	<i>ts</i>
А/Нью-Джерси/3/65 [27]	6,5	<i>ts</i>
А/Ленинград/147/65 [2]	2,0	<i>non-ts</i>
А/Ленинград/151/65 [2]	2,0	<i>non-ts</i>
А/Калифорния/1/66 [36]	5,8	<i>ts</i>
А/Ленинград/3178/67	6,2	<i>ts</i>
А/Ленинград/3187/67	5,7	<i>ts</i>
А/Токио/3/67 [36]	4,2	$\pm ts$

¹Ссылка на литературный источник:

Таблица Б.4 - Характеристика эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2) по способности к репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при повышенной температуре в сравнении с оптимальной (RСТ₄₀)

Штамм вируса гриппа	RСТ ₄₀ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	<i>ts</i> фенотип	Период циркуляции антигенных вариантов эталонного вируса (гг.)	
А/ГОНКОНГ/1/68	1,7	<i>non-ts</i>	1968-1971	
А/Аичи/1/68	1,5	<i>non-ts</i>		
А/Удорн/72 [15] ¹	0,2	<i>non-ts</i>		
А/АНГЛИЯ/42/72	1,5	<i>non-ts</i>	1972-1973	
А/ВИКТОРИЯ/35/72	1,7	<i>non-ts</i>		
А/ПОРТ ЧАЛМЕРС/1/73	0,5	<i>non-ts</i>	1973-1975	
А/Ленинград/74 [24]	0,2	<i>non-ts</i>		
А/Ленинград/538/74 [34, 76, 105]	0,1	<i>non-ts</i>		
А/ВИКТОРИЯ/3/75	2,4	<i>non-ts</i>	1975-1977	
А/Ленинград/10/75	0	<i>non-ts</i>		
А/Хабаровск/29510/75	4,8	<i>ts</i>	1976	
А/МОСКВА/406/76	7,0	<i>ts</i>		
А/Хабаровск/15/76 [532]	6,8	<i>ts</i>		
А/Пойт/1/76 [77]	5,5	<i>ts</i>		
А/Пойт/5/76 [77]	3,3	<i>non-ts</i>		
А/Крет/1/76 [77]	4,3	$\pm ts$		
А/Севр/1/76 [77]	6,5	<i>ts</i>		
А/Эври/1/76 [77]	4,3	$\pm ts$		
А/Кальви /1/76 [77]	2,3	<i>non-ts</i>		
А/Булог/1/76 [77] ²	3,8	<i>non-ts</i>		
А/ТЕХАС/1/77	0,8	<i>non-ts</i>		1977-1979
А/Аляска/6/77 [196, 371]	0,6	<i>non-ts</i>		
А/БАНГКОК/1/79	8,0	<i>ts</i>		1979-1982
А/Бангкок/2/79	6,0-8,0	<i>ts</i>		
А/Ленинград/322/79	8,0	<i>ts</i>		
А/ФИЛИППИНЫ/2/82	6,4	<i>ts</i>	1982-1985	
А/СССР/2/82 [24]	7,5	<i>ts</i>		
А/Ленинград/83/82 [24]	4,2	$\pm ts$		
А/Ленинград/86/82 [24]	4,5	$\pm ts$		
А/Ленинград/87/82 [24]	4,5	$\pm ts$		
А/Ленинград/659/82 [24]	4,7	<i>ts</i>		
А/Филиппины/2/83 [29]	5,0	<i>ts</i>		
А/Ленинград/234/84	7,3	<i>ts</i>		
А/Ленинград/66/85 [30]	2,3	<i>non-ts</i>	1985-1986	
А/Ленинград/111/85 [30]	6,0	<i>ts</i>		
А/Ленинград/166/85 [22, 30]	5,8	<i>ts</i>		
А/Ленинград/203/85 [30]	2,5	<i>non-ts</i>		
А/Ленинград/234/85 [14]	4,5	$\pm ts$		
А/СССР/2/85 [22,105]	6,5	<i>ts</i>		
А/МИССИСИПИ/1/85 [22]	5,8	<i>ts</i>		
А/Ленинград/38/86 [30, 45]	1,2	<i>non-ts</i>	1986-1987	
А/Ленинград/153/86 [45]	0,3	<i>non-ts</i>		
А/ЛЕНИНГРАД/360/86 [30]	3,7	$\pm ts$		

Продолжение таблицы Б.4

А/СЫЧУАНЬ/2/87	6,8	<i>ts</i>	1987-1989
А/Днепропетровск/2918/87 ²	8,0	<i>ts</i>	
А/Одесса/660/88 ²	8,0	<i>ts</i>	
А/Москва/133/7/89 ²	7,0	<i>ts</i>	
А/Харьков/38/91 ²	8,5	<i>ts</i>	
А/ШАНГДОНГ/9/93	5,0	<i>ts</i>	1993-1994
А/ИОГАННЕСБУРГ/33/94	6,5	<i>ts</i>	1994-1996
А/НАНЧАНГ/933/95	7,0	<i>ts</i>	1995-1997
А/СИДНЕЙ/5/97	1,0	<i>non-ts</i>	1997-2000
А/ПАНАМА/2007/99	1,3	<i>non-ts</i>	2002-2004
А/МОСКВА/10/99	1,5	<i>non-ts</i>	2001-2003
А/Воронеж/511/00	5,0	<i>ts</i>	
А/С.-Петербург/128/00	7,5	<i>ts</i>	
А/Липецк/44/00	3,0	<i>non-ts</i>	
А/Кумамото/102/02	1,5	<i>non-ts</i>	
А/ВАЙОМИНГ/03/03	8,5	<i>ts</i>	2003-2004
А/ВЕЛЛИНГТОН/01/04	9,1	<i>ts</i>	2004-2005
А/Малайзия/01/04	7,3	<i>ts</i>	
А/КАЛИФОРНИЯ/07/04	2,2	<i>non-ts</i>	2005-2006
А/ВИСКОНСИН/67/05	6,3	<i>ts</i>	2006-2008
А/БРИСБЕН/10/07	7,5	<i>ts</i>	2008-2009
А/ПЕРТ/16/09	6,0	<i>ts</i>	2009-2011
А/Индиана/10/11(Н3N2v)	0,0	<i>non-ts</i>	2011
А/ВИКТОРИЯ/361/11	1,7	<i>non-ts</i>	2011 2015
А/ТЕХАС/50/12	4,8	<i>ts</i>	
А/Гавайи/22/12	3,0	<i>non-ts</i>	
А/Огайо/02/12	2,9	<i>non-ts</i>	

¹Ссылка на литературный источник.²Вирус выделен от больного в межэпидемический период.

Таблица Б.5 - Фенотипические свойства вирусов гриппа В, изолированных в различные годы (чувствительность к повышению температуры инкубации в РКЭ, чувствительность к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади)

Вирус	Титр вируса (lg ЭИД ₅₀ /мл) при t°С			фенотип		Период циркуляции антигенных вариантов эталонного вируса (гг.)
	32°	37°	38°	37°/38°С	is/ir ³	
<i>Ранние вирусы гриппа В</i>						
В/ЛЕЕ/40 ¹	8,2	7,2	5,4	non-ts	ir	1940-1951
В/Ленинград/14/55	7,7	7,2	5,4	non-ts	ir	1952-1966
В/Ленинград /95/59	7,7	7,9	3,7	non-ts/±ts	ir	
В/Энн Арбор/1/66	8,0	6,0	н.и. ²	non-ts/н.и.	ir	
В/Душанбе/62/66	8,2	5,7	н.и.	non-ts/н.и.	ir	
В/Ленинград/2/67 [75] ⁴	7,7	5,8	н.и.	non-ts/н.и.	н.и.	1967-1972
В/СССР/69	6,8	5,7	3,5	non-ts	ir	
В/Россия/69	9,5	9,0	8,0	non-ts	ir	
В/ГОНКОНГ/5/72	н.д. ⁵	н.д.	н.д.	non-ts	н.и.	1972-74, 1975-77, 1978-79
В/Гонконг/8/73	8,0	6,0	н.и.	non-ts/н.и.	ir	
В/Англия/2668/76	7,7	7,2	7,2	non-ts	н.и.	1976
В/Ленинград/14/3/76	7,2	4,1	2,9	non-ts/±ts	н.и.	
<i>Вирусы гриппа эволюционной линии В/Виктория/2/87</i>						
В/СССР/100/83	н.д.	н.д.	≤1,2	ts/ts	ir	1983-1986
В/Ленинград/1983-84г. [21]	н.д.	н.д.	≤1,2	ts/ts	ir	
В/Ленинград/693/83* [21]	9,2	7,2	≤1,2 ⁶	non-ts/ts	н.и.	
В/Ленинград/104/84 [21]	7,7	н.и.	4,7	non-ts	ir	
В/Техас/1/84 [107]	8,2	≤1,2	≤1,2	ts	ir	
В/Киев/2186/85	9,2	≤1,2	≤1,2	ts	н.и.	
В/Рига/3968/86	6,7	≤1,2	≤1,2	ts	н.и.	
В/ЭНН АРБОР/1/86	8,0	7,0	н.и.	non-ts/н.и.	ir	1986-1988
В/Энн Арбор /2/86	8,2	2,7	1,7	ts	ir	
В/ВИКТОРИЯ/2/87	6,7	3,7	3,7	non-ts	ir	1987-1988
В/СССР/2/87 межэпидем.	7,7	н.и.	3,2	н.и./±ts	н.и.	
В/СССР/3/87	7,7	3,2	н.и.	ts/н.и.	ir	
В/ШАНГДОНГ/7/97	8,2	7,7	6,7	non-ts	ir	1997-2000
В/Тегеран/80/02	9,2	7,2	1,7	non-ts/ts	н.и.	
В/ГОНКОНГ/330/01	9,5	9,0	7,5	non-ts	ir	2002-2004
В/Гавай/10/01	8,0	2,7	2,2	ts	ir	
В/Акита/5/02	8,7	3,2	≤1,2	ts	ir	
В/МАЛАЙЗИЯ/2506/04	8,7	5,7	≤1,2	non-ts/ts	ir	
В/Гавай/13/04	7,2	5,2	≤1,2	non-ts/ts	ir	2006-2008
В/Огайо/1/2005	8,7	1,2	≤1,2	ts	ir	
В/БРИСБЕН/60/08	8,7	≤1,2	≤1,2	ts	ir	
В/Техас/26/08	8,7	≤1,2	≤1,2	ts	ir	
В/Брисбен/33/08	7,2	≤1,2	≤1,2	ts	ir	2009-2012
В/Невада/3/11	8,7	≤1,2	≤1,2	ts	is	
В/Техас/02/13	6,7	3,8	2,5	non-ts/±ts	ir	
2013						
<i>Вирусы гриппа эволюционной линии В/Ямагата/16/88</i>						
В/ЯМАГАТА/16/88	9,2	2,7	≤1,2	ts	is	1988-1993
В/Пекин/203/89	8,5	5,2	4,2	non-ts/±ts	is.	

Продолжение таблицы Б.5

В/ПАНАМА/45/90	6,8	5,7	2,5	<i>non-ts/±ts</i>	н.и.	1993-1995	
В/ПЕКИН/184/93	7,2	1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>	1995-2000	
В/ХАРБИН/07/94	7,7	н.и.	4,7	<i>non-ts</i>	<i>ir</i>		
В/Санкт-Петербург/92/95	7,7	2,7	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/ЯМАНАШИ/166/98	7,2	н.и.	4,7	<i>non-ts</i>	<i>ir</i>	2000-2001	
В/СИЧУАНЬ/379/99	8,2	1,7	1,7	<i>ts</i>	<i>ir</i>	2001-2002	
В/ИОГАННЕСБУРГ/05/99	7,5	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>ir</i>		
В/Архангельск/312/99	8,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Шанхай/72/99	5,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Токио/53/99	8,7	2,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Оклэнд/1/00	6,7	2,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Мехико/84/00	8,2	1,7	1,0	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Гуандонг/120/00	8,2	2,2	1,7	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Виктория/504/00	8,2	6,7	3,2	<i>non-ts/ ts</i>	<i>is</i>		
В/Улан-Уде/3/01	5,2	2,2	1,2	<i>non-ts/±ts</i>	<i>is</i>		
В/ШАНХАЙ/361/02	7,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		2004-2005
В/Джилин/20/03	6,7	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Флорида/7/04	8,2	2,7	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		2008-2009
В/ФЛОРИДА/4/06	7,7	2,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/ВИСКОНСИН/1/10	6,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>	2012-2013	
В/Бангладеш/1994/10	7,3	1,3	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>		
В/Техас/06/11	8,0	3,0	≤1,2	<i>ts</i>	<i>is</i>	2013-2014	
В/МАССАЧУСЕТТС/2/12	8,2	7,3	2,2	<i>non-ts/ts</i>	<i>is</i>		

¹эталонные вирусы прописаны заглавными буквами;

²н.и. – не исследовали;

³вирусы считали чувствительными к термостабильным ингибиторам (*is*) если титр их ингибиции в РТГА с нормальной сывороткой крови лошади был ≥80, и устойчивыми (*ir*) если титр их ингибиции в РТГА с нормальной сывороткой крови лошади был ≤ 40;

⁴ссылка на литературный источник:

⁵н.д. – нет данных; информация получена из литературного источника, где указан фенотип, без приведения цифровых значений;

⁶инфекционный титр вируса ≤1,2lg ЭИД₅₀/мл – ниже порога разрешения эксперимента, это означает, что в 10⁻¹ разведении репродукция вируса не идентифицируется;

* межэпидемический изолят;

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1 - Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для определения методом RFLP-анализа состава генома штаммов, подготовленных при скрещивании донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с современными эпидемическими штаммами вируса гриппа А (H1N1) или А (H3N2)

Ген	Праймер	Нуклеотид ¹	Нуклеотидная последовательность праймера	Длина фрагмента ²	Донор аттенуации			Эпидемический вирус		
					Фермент	Нуклеотид ³	Размер фрагментов ⁴	Фермент	Нуклеотид ³	Размер фрагментов ⁴
Праймеры					А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)			А (H1N1) и А (H3N2)		
PB2 ⁵	F	1374	GGGAATTGAACATATCGA	240	<i>Mse</i> I	1459	155, 85	<i>Mse</i> I	Нет	Не режется ⁷
	R	1614	TATTGTCAGTTTCTCTGT							
PB1	F	127	GGAACAGGRTACACCATGG	1135	<i>Hind</i> III	Нет	Не режется	<i>Hind</i> III	817	690, 445
	R	1262	TTGAACATGCCCATCATATYC							
PA ⁵	F	8	GCAGGTAAGTATCCGAAATGGAAG	317	<i>Bam</i> HI	102	223, 94	<i>Bam</i> HI	Нет	Не режется
	R	325	CAGCTCCTGTAGTGTGCAAATA							
NA ⁶	F	14	GTGAAGATGAATCCAAATCAA	761	<i>Mse</i> I	129, 494	365, 281, 115	<i>Mse</i> I	Нет	Не режется
	R	775	AGTATCGGCTCTTCCTGATGC							
NP ⁵	F	886	TATGGACCTGCCGTAGCC	314	<i>Eco</i> R I	913	287, 27	<i>Eco</i> R I	Нет	Не режется
	R	1200	GTACCTGCTTCTCAGTTC							
M ⁵	F	785	CCCTCTTGTGTGCGCCG	216	<i>Tsp</i> 509 I	864	137, 79	<i>Tsp</i> 509 I	Нет	Не режется
	R	1001	CAGCTCTATGCTGACAAA							
NS	F	622	AGAGATTCGCTTGGAGAAGC	268	<i>Cac</i> 8I	Нет	Не режется	<i>Cac</i> 8I	798	176, 92
	R	890	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTA							

¹Стартовая позиция нуклеотида с 5'-конца «+» цепи РНК; праймер F – прямой (Forward), R – обратный (Reverse).

²Длина амплификата.

³Позиция нуклеотида, по которой происходит или не происходит рестрикция амплифицированного фрагмента специфической рестриктазой.

⁴Размер фрагментов, на которые режется амплификат под воздействием специфической рестриктазы.

⁵Описано в [360].

⁶Описано в [Klimov, A.I. Nucleotide sequence of the neuraminidase gene of influenza A/Leningrad/ 134/17/57 (H2N2) virus and tho its live-attenuated cold-adapted variants / A.I. Klimov, J.R. Romanova, A.Y. Egorov et al. // Viral genes. - 1995. - 10. - P. 95-98.], правомочно для сравнения нейраминидаз N2 – донора аттенуации с эпидемическими вирусами А (H3N2).

Фрагмент NA гена эпидемических вирусов А (H1N1) не амплифицируется при использовании данной пары праймеров.

⁷У данного амплификата нет сайта рестрикции для используемой рестриктазы.

Таблица В.2 - Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для определения методом RFLP-анализа состава генома штаммов, подготовленных при скрещивании донора аттенуации В/СССР/60/69 с современными эпидемическими штаммами вируса гриппа В, принадлежащими «Викторианской» ветви или ветви «Ямагата»

Ген	Праймер	Нуклеотид ¹	Олигонуклеотидная последовательность праймера	Длина фрагмента ²	Донор аттенуации			Эпидемический вирус		
					Фермент	Нуклеотид ³	Размер фрагментов ⁴	Фермент	Нуклеотид ³	Размер фрагментов ⁴
Праймеры					В/СССР/60/69			Викторианская ветвь		
PB2	F	1743	CAATGGGATGCATTTGAAGC	287	<i>Msc I</i>	1793	236, 51	<i>Msc I</i>	Нет	Не режется ⁵
	R	2029	GTTAGGACTTCTGTTTGTGG							
Праймеры					В/СССР/60/69			Ветвь Ямагата		
PB2	F	1743	CAATGGGATGCATTTGAAGC	287	<i>Hind III</i>	1938	196, 91	<i>Hind III</i>	Нет	Не режется
	R	2029	GTTAGGACTTCTGTTTGTGG							
Праймеры					В/СССР/60/69			Любые вирусы гриппа В		
NA	F	591	GGTCCGCATGCCATGATGG	605	<i>Afl II</i>	Нет	Не режется	<i>Afl II</i>	812	221, 384
	R	1196	CCATGGGTCTCCATCATACTT							
PB1	F	906	AGGAGGGATCAGCATGACAG	379	<i>Bsp HI</i>	1085	200, 179	<i>Bsp HI</i>	Нет	Не режется
	R	1284	TCCAACACGGTAGATAGCA							
PA	F	1539	CAATCTCATCTGAGGGGAGA	344	<i>Bcl I</i>	1793	255, 89	<i>Bcl I</i>	Нет	Не режется
	R	1882	CCAATACTGAAAGTTTTGGG							
NP	F	1148	AATATGGCAACACCTGTTC	401	<i>Avr II</i>	1286	263, 138	<i>Avr II</i>	Нет	Не режется
	R	1548	TTGACATCTGCATCACGTCC							
M	F	319	GCTGAGAGAAAAATGAGAAG	337	<i>Bsa I</i>	Нет	Не режется	<i>Bsa I</i>	561	243, 94
	R	655	CTCCAATGTTGCTTTGCAGC		<i>Bgl II</i>			<i>Bgl II</i>	523	205, 132
NS	F	142	CTTTCATGGCAAAGAGCCCT	308	<i>Mae I</i>	371	230,78	<i>Mae I</i>	Нет	Не режется
	R	449	GGTCTTCTTCTATGTCATC							

¹Стартовая позиция нуклеотида с 5'-конца «+» цепи РНК; праймер F – прямой (Forward), R – обратный (Reverse). ²Длина амплификата.

³Позиция нуклеотида, по которой происходит или не происходит рестрикция амплифицированного фрагмента специфической эндонуклеазой. ⁴Размер фрагментов, на которые режется амплификат под воздействием специфической эндонуклеазы. ⁵У данного амплификата нет сайта рестрикции для используемой эндонуклеазы.

Таблица В.3 - Программы, используемые для ПЦР-анализа состава генома реассортантов, полученных при скрещивании доноров аттенуации и «диких» вирусов

Про- грамма	Предварительный нагрев		Основные этапы ПЦР							Пост-ПЦР	
			Денатурация		Отжиг		Элонгация		Число циклов		
	время	темп.	время	темп.	время	темп.	время	темп.		время	темп.
1	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	30 сек.	55°C	1 мин.	68°C	30	7 мин.	68°C
2	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	30 сек.	60°C	1 мин.	72°C	30	7 мин.	72°C
3	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	30 сек.	63°C	1 мин.	72°C	30	7 мин.	72°C
4	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	30 сек.	55°C	1 мин.	72°C	30	7 мин.	72°C
5	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	55°C	1 мин.	68°C	45	7 мин.	68°C
6	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	55°C	1 мин.	68°C	30	7 мин.	68°C
7	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	63°C	1 мин.	68°C	30	7 мин.	68°C
8	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	61°C	1 мин.	68°C	45	7 мин.	68°C
9	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	50°C	1 мин.	68°C	45	7 мин.	68°C
10	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	61°C	1 мин.	68°C	30	7 мин.	68°C
11	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	1 мин.	50°C	1 мин.	68°C	30	7 мин.	68°C
12 ¹	4 мин.	94°C	30 сек.	94°C	30 сек.	48°C	1 мин.	72°C	20	7 мин.	72°C

¹Градиентная ПЦР программа (начальная температура 53°C, конечная температура 48°C; снижение температуры в каждом цикле на 0,5°C; от начала и до конца – 11 циклов).

Таблица В.4 - Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Mix (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа А (H1N1) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

Ген	Вирус	Позиция нуклеотида ³	Длина фрагмента	Прямой праймер (F)		Обратный праймер (R)		Про-грамма ⁴
				Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	
PB2	WT ¹	330–1108	778	AAATGGACCAGTGGCAARTACTA	23	CATATCCCTCATGCACADTTAGC	23	4
	A17 ²	1068–1479	411	CAATCTTCAAACATTGAAAATAAGG	25	GCCCATTTTGCTGACTCTTAAC	22	4
PB1	WT	433–692	259	CAGCCTGCTGCCACAGCATTG	21	GTTAATGCTCTAATTAGGTAAC	22	4
	A17	1206–1816	610	TCTCCTAATAGATGGCACAGTC	22	AGTTTGGTCCCTCCATCCGAAAT	22	4
PA	WT	1509–2036	527	GAGAAAGACCAATTTGTACGGC	22	GCCTGAACAATGAGGAGCAAC	21	4
	A17	798–1065	267	GCCTTTTCTGAAAACAACACCAA	23	GTCCTGCAGTTCTGCCAGTAAT	22	4
HA	WT	1–1110	1109	AGCAAAAAGCAGGGGAAAATAA	21	CCACCCATCTACCATTCC	18	4
	A17	6–891	885	AAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAA	30	CCTTCTGTTTTTCATGATCCCTGAACTACCT	30	4
NP	WT	1249–1502	253	TCTGCGGGCCAAATCAGCAC	20	GATCCTTCATTA CT CATGTCAAAG	24	4
	A17	666–1121	455	GAGAGGTGAGAAATGGGCGG	19	GAAAGTTTCCCCCTTGGGAT	20	4
NA	WT	427–643	216	AAGGTGCTCTATTAAT	17	TATTTTAGTACAGCCAC	17	12
	A17	51–750	699	GCTCTGYTCTCTCACCATT	20	CCATCAGTCATTA CT ACTG	19	12
M	WT	192–470	278	CTAAGGGGATTTTAGGATTTGTG	23	CACATATAAGGCCAAATGCTGA	22	4
	A17	455–994	539	TGAAGTGGCCTTGGGCCTGG	20	TTTTCAGACCGTGTTTAAAGAAG	23	4
NS	WT	441–711	270	GACCGGTTGGAGAATCTGAC	20	AGCCATCTTATTTCTTCAA ACTTC	24	4
	A17	14–788	774	TGACAAAGACATAATGGATCCTA	23	ATTTGCTCAAAA CT ATTTCTCTGTTA	25	4

¹Современный эпидемический (сезонный) вирус гриппа А (H1N1).

²Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

³Позиция нуклеотида представлена с 5'-конца «+» цепи РНК.

⁴Описание программ представлено в таблице В3.

Таблица В.5 - Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Mix (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа А (H3N2) с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

Ген	Вирус	Позиция нуклеотида ³	Длина фрагмента	Прямой праймер (F)		Обратный праймер (R)		Про-грамма ⁴
				Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	
PB2	WT ¹	1477–2115	638	GGTGTGGATGAATACTCCAGTA	22	CTATAATGAGAAACCCTCTCAAG	23	4
	A17 ²	1273–2118	845	GGTGATCTGAATTTTCGTTAATAGG	24	CAGAATGAGGAATCCTCTCAGA	22	4
PB1	WT	1755–2223	468	GAAGCTGTGGGATCAAACCCAA	22	TCCAGACTCGAAGTCAATTCTG	22	4
	A17	1206–2169	963	TCTCCTAATAGATGGCACAGTC	22	CACCATGCTGGAAATFCCAAC	22	4
PA	WT	970–1851	881	GGATGGAAAGAACCCTTATATAGTC	24	TTTGGTCATGTCTTTCTCTTTAATC	25	4
	A17	914–1712	798	ACGAAGGAGAGGGAATACCAC	21	AAGAACATGGGCCTTGACACC	21	4
HA	WT	29–593	564	CATGAAGACCATCATTTGCTTTGAGCTAC	28	GTCATTGTTTGGCATAGTCACGTTGAG	27	4
	A17	6–858	852	AAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAA	30	TTCGATATTTTGAATCCATACTCTGGTGCA	30	4
NP	WT	135–1122	987	GAAGATGATTGATGGAATTGGGA	23	TGAMAGTTTCCCYCGMGGAGA	21	4
	A17	640–1331	691	CGTGGGATCAATGATCGGAAC	21	GAATGCTGCCATGATGGTTGGT	22	4
NA	WT	34–568	534	AAAGATAATAACRATTGGCTCTGTT	25	ACAACCTTGAGCTGGACCATGCTATG	25	2
	A17	902–1334	432	TGGAAAGGCTCTAATAGGCCCGTTA	25	TCCACCATACTCTAGTCTCCTGTGG	25	2
M	WT	51–547	496	CGTATGTTCTCTCTATCGTTCCA	23	TYTTATTAATGGATTGGTTGTTGC	24	4
	A17	53–887	834	TACGTTCTCTCTATCGTCCCG	21	ACCGTGTTTAAAGAAGCGATAATT	24	4
NS	WT	86–478	392	ACAAGTTGTAGACCAAGAACTGA	23	GGTGAAAGCCCTTAGTAATACTAT	24	4
	A17	13–726	713	GTGACAAAGACATAATGGATCCT	23	TATTTCTTCGAACTTTTGACCTAAT	25	4

¹Современный эпидемический (сезонный) вирус гриппа А (H3N2).

²Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

³Позиция нуклеотида представлена с 5'-конца «+» цепи РНК.

⁴Описание программ представлено в таблице В3.

Таблица В.6 - Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Mix (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании современных эпидемических (сезонных) штаммов вируса гриппа В с донором аттенуации В/СССР/60/69

Ген	Вирус	Позиция нуклеотида ³	Длина фрагмента	Прямой праймер (F)		Обратный праймер (R)		Про-грамма ⁴
				Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	
PB2	WT ¹	987–1910	923	AGACAAAGACAAAGATTTGGAC	22	ССТТААТТТТGGTGGTGAGAAACAA	25	7
	B60 ²	805–1030	225	TGATTGTAGCTTGTAGGAAAATAG	24	GATATTCTCTTTAGTTCAAGCCTC	24	7
PB1	WT	1409–1830	421	ACGACTTTTACCGAACATGTAAT	24	YAAGTTTCTCAAATTGTAATGTTG	25	8
	B60	525–1171	646	AGATATCATTTGATTCATTGGACAAA	25	CTTCATTATATCTTTCTAATGGTATAT	27	6
PA	WT	694–1106	412	GTYCTCATAGGRGAAGAAGATG	22	GGTTTTCTGTAAAYTCGTTACTC	22	6
	B60	1920–2237	317	AAAGCACTAAGAGTAATATTCACC	24	TACCAAATTGAGCGCTATGCTC	22	9
HA	WT	194–484	290	CTYATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAR	28	TGTAGGGTCCTCCTGGTGCHT	21	11
	B60	504–823	319	TTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAA	25	CAACAACAATTCTGCCGCTTTGTTT	25	1
NP	WT	995–1209	214	GAYCTAACCCCTGCTTGCTCGT	21	AATTGYGATTTTRTCYTTTGCATCA	24	9
	B60	1164–1784	620	TTTCCATATTAAGAATGGGAGACA	24	AACGTA CTGAAACAGTCACAGC	22	5
NA	WT	470–841	371	GGGGGATACTACAATGGAACAAGAG	25	TTTTATTATTTCGGCCCTCTCGAATC	25	3
	B60	871–1109	238	TACTGAAGAATGCACATGCGGGTTC	25	CAAATCCTCCTTTGATGCCTCCAAG	25	3
M	WT	486–1137	651	AGCATCACATTCACACAGGGCT	22	ACGGGGCTGCAACTTATTTGA	21	5
	B60	920–374	546	AAGGCCACGAAAGCTCAGCAT	21	GTTTATTGTCTCTTTATTTGGATT	24	6
NS	WT	764–1032	268	AACTCACTCTTCGAGCGTCTTA	22	CCTTCATTTTCATACAATGTTTCTAAT	26	10
	B60	369–804	435	CAACTAGCAACTGTCCAAACTG	22	GGCTTTGAATGTCTTCATCAAA	23	7

¹Современный эпидемический (сезонный) вирус гриппа В (Викторианской ветви или ветви Ямагата).

²Донор аттенуации В/СССР/60/69.

³Позиция нуклеотида представлена с 5'-конца «+» цепи РНК.

⁴Описание программ представлено в таблице В3.

Таблица В.7 - Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома методом Мiх (мультиплекс)-ПЦР реассортантов, полученных при скрещивании штаммов подобных пандемическому вирусу А/Калифорния/07/09 (H1N1), с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

Ген	Вирус	Позиция нуклеотида ³	Длина фрагмента	прямой праймер (F)		обратный праймер (R)		Про-грамма ⁴
				Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	
PB2	WT ¹	1414–1781	367	GAGATGTCGCTGAGAGGGA	19	CCACTGTACCGGCTTCTGG	19	4
	A17 ²	1068–1479	411	CAATCTTCAAACATTGAAAATAAGG	25	GCCCATTTTGCTGACTCTTAAC	22	4
PB1	WT	301–588	287	GGAATATTTGAGAATTCATGCC	22	GGTCATGTTGTCTCTTACTCTC	22	4
	A17	1206–2169	963	TCTCCTAATAGATGGCACAGTC	22	CACCATGCTGGAAATCCAACT	22	4
PA	WT	151–832	651	TTCCATTTTCATCGACGAACGG	21	GATGGCAAAGAGGCCCATCA	20	4
	A17	798–1065	267	GCCTTTTCTGAAAACAACACCAA	23	GTCCTGCAGTTCTGCCAGTAAT	22	4
HA	WT	245–842	597	CAGAGTGTGAATCACTCTCCA	21	CCAGATCCAGCATTTCTTTC	21	4
	A17	6–891	885	AAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAA	30	CCTTCTGTTTTTCATGATCCCTGAACTACCT	30	4
NP	WT	35–662	627	AAATGGAGACTGGTGGGGAG	20	CTTTCATAAGCAACCCTTGTCC	22	4
	A17	640–1331	691	CGTGGGATCAATGATCGGAAC	21	GAATGCTGCCATGATGGTTGGT	22	4
NA	WT	770–1114	334	GAATAGAAAAGGGAAGATAGTC	23	CAAAACCGTTTCTTGAAC TAATG	23	12
	A17	902–1334	432	TGGAAAGGCTCTAATAGGCCCGTTA	25	TCCACCATACTCTAGTCTCCTGTGG	25	2
M	WT	325–789	464	TTCCATGGGGCCAAGGAGG	19	CCAATGATATTTGCTGCAATGAC	23	4
	A17	455–994	539	TGAAGTGGCCTTGGGCCTGG	20	TTTCAGACCGTGTTTAAAGAAG	23	4
NS	WT	334–758	424	GTAGGCCCTCTTTGCGTGC	19	GTCGAAACTATTCTCTGTGCT	23	4
	A17	13–726	713	GTGACAAAGACATAATGGATCCT	23	TATTTCTTCGAACTTTTGACCTAAT	25	4

¹Вирус, подобный современному пандемическому вирусу гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1).

²Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

³Позиция нуклеотида представлена с 5'-конца «+» цепи РНК.

⁴Описание программ представлено в таблице В3.

Таблица В.8 - Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа генома реассортантов методом Mix (мультиплекс)-ПЦР, полученных при скрещивании штаммов для инактивированной гриппозной вакцины, подготовленных на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А (H5N1) и вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

Ген	Вирус	Позиция нуклеотида ³	Длина фрагмента	прямой праймер (F)		обратный праймер (R)		Про-грамма ⁵
				Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	Длина праймера	
PB2	WT ¹	248–598	350	ATGAATGATGCCGGATCAGAC	21	TGTCCTAGCAGCAATAATCAAG	23	4
	A17 ²	1068–1479	411	TTAATAGGGCAAATCAGCGATTG	24	GAATTGTAGTCTCTTAGTGGTC	23	4
PB1	WT ¹	1407–1910	503	CGGAGTCGACAGGTTTTATC	20	TTCAGTGGGTTGCATAAACGC	21	4
	A17	1206–1816	610	TCTCCTAATAGATGGCACAGTC	22	AGTTTGGTCCCTCCATCCGAAAT	22	4
PA	WT ¹	836–1241	405	CGAATGGGCCTCCCTGTTC	19	CAACTTGCAAGCGACCTCAAT	21	4
	A17	798–1065	267	GCCTTTTCTGAAAACAACACCAA	23	GTCCTGCAGTCTGCCAGTAAT	22	4
HA	WT ⁴	319–901	582	AAGATCAATCCAGCCAATGACC	22	TGTTGCAGTTACCATATTCCAAC	23	4
	A17	6–891	885	AAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAA	30	CCTTCTGTTTTTCATGATCCCTGAACTACCT	30	4
NP	WT ¹	1085–1352	267	TCAAAGGGACGAAGGTGCTC	20	CTCCCCTCTGTATTCCCAT	19	4
	A17	666–1121	455	GAGAGGTGAGAATGGGCGG	19	GAAAGTTTCCCCCTTGGGAT	20	4
NA	WT ⁴	425–1186	761	GTTGTCCTGTGGGTGAGGC	19	CTGTCAGTCTGGATGCTGG	20	12
	A17	51–750	699	GCTCTGYTCTCTCACCATT	20	CCATCAGTCATTACTIONG	19	12
M	WT ¹	503–814	311	GCTAGTCAGGCTAGACAAATG	21	CAGTCCGTATTTAAAGCGACGG	20	4
	A17	455–994	539	TACGTTCTCTCTATCGTCCCG	21	ACCGTGTTTAAAGAAGCGATAATT	24	4
NS	WT ¹	212–784	572	GACATCGAGACAGCCACAC	19	CCTTAGCAATATTAGAGTCTCC	22	4
	A17	14–788	774	GGGACTGGTTCATGCTAATGC	21	CTTGTTCCACAAATAGTAGC	23	4

¹Вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1), используемый в качестве донора внутренних генов при подготовке инактивированной гриппозной вакцины.

²Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

³Позиция нуклеотида представлена с 5'-конца «+» цепи РНК.

⁴Современный вирус гриппа птиц А (H5N1).

⁵Описание программ представлено в таблице В3.

Таблица В.9 - Список эндонуклеаз рестрикции и олигонуклеотидных праймеров, использованных для анализа состава генома и сохранности мутаций, специфичных для донора аттенуации штаммов вируса гриппа А [360]

Праймеры	Олигонуклеотидная последовательность праймеров	Размер амплификата	Рестрик-таза	А/Ленинград/134/57 (H2N2)		А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	
				Сайт рестрикции	Размер фрагментов	Сайт рестрикции	Размер фрагментов
PB2-F1374 PB2-R1614	GGGAATTGAACATATCGA TATTGTCAGTTTCTCTGT	240	Tru 9I	-	-	1459	155, 85
PB1-F740 PB1-R 1044	GAGCAATTGCAACACCCG TGCGATGCTCAGGACGTT	304	Hind III	819	225, 79	-	-
PB1 - F1767 PB1-R1986	GCAAACCCGCTCAAAGGCCAGACTTTTG GCTCTTGGCTGGACCGTGAGCTGG	219	BstXI	1795	192, 27	-	-
PA-F8 PA-R325	GCAGGTA CTGATCCAAAATGGAAG CGACTCCTGTGGTGTTGCAGATG	317	Bam HI	-	-	107	218, 99
PA - F900 PA-R1077	TGAGGACCCAAGTCACGA CTCATTCTCAATGCTCTGCAGTTCTGCCATTA	177	Vsp I	-	-	1045	145, 32
NA-F14 NA-R-677	GTGAAGATGAATCCAAATCAA GAGACCATGAACCAATACTGTC	663	Tru 9I	-	-	130, 495	365, 182, 116
M- F39 M-R249	CCGAGGTCGAAACTGACGTTCTCTCGATC GCGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTC	210	Ple 191	-	-	68	181, 29
NS-F673 NS-R890	CAAAACAGAAACGGAAAA AGTAGAAACAAGGGTGT TTTTATCATTA A	217	BstC 81	798	125, 92	-	-

Таблица В.10 - Сиквенс нуклеотидных и аминокислотных последовательностей чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69 (525)

НА

Аминокислотный сиквенс

МКАИIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTTPTKSHFANLKGQT
 RGKLCPNCLNCTDLVALGRPKCTGTIPSAKVSILHEVKPVTSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRG
 YENIRLSTRNVINAETAPGGPYTVGTSGSCPNTNGKGFETMAWAVPKNKNKTATNPLTVE
 VPYICTKGEDQITVWGFHSDDETQMVILYGESKPQKFTSSANGVTTYVVSQIGGFNPQTEDEG
 LKQSGRIVVDYIVQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGG
 LNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGM
 IAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILE
 LDEKVDDLRLADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHK
 CNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFI
 VYMVSRDNVSCSICL

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATG
 GTAGTAACATCAAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACCTCACCCCAT
 GTGGTCAAAACTGCTACTCAAGGGGAAGTCAACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACA
 ACACCTACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAAACTATGC
 CCAAACGTCTCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAGTGTACGGGG
 ACCATACCTTCGGCAAAAGTTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCTGGGTGCT
 TTCCTATAATGCACGACAGAACAATAATCAGACAACCTAATCTTCTCAGAGGATATG
 AAAATATCAGGTTATCAACCCGTAACGTTATCAATGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCCT
 ACACAGTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGAAA
 CAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAAAACAACAAACAGCAACGAATCCATTAACAGTA
 GAAGTACCATACATTTGTACAAAAGGAGAAGACCAATTAAGTGTGGGGGTTCCACTCT
 GATGACGAAACCCAAATGGTAATACTCTATGGAGAATCGAAGCCTCAAAAGTTCACCTCA
 TCTGCCAATGGAGTAACCACATATTATGTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCCAATCAAACAG
 AAGACGAAGGGCTAAAACAAGCGGCAGAATTGTTGTTGATTACATAGTGCAAAAACCT
 GGAAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGC
 GCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGC
 CTCCACGAAAAATACGGTGGATTAACAACAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGC
 AAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAA
 CCAAATATAGACCGCCTGCAAAACTATTAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTG
 GTTTCTTGGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCATG
 GAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAG
 ATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAAAATCTTCAAAGACTAAGC
 GGAGCAATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAGGTGGATGATCT
 AAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAAT
 AATAACAGTGAAGATGAGCATCTCTTGGCACTTGAAGAAAACCTGAAGAAAATGCTGG
 GCCCTCTGCTGTAGACATAGGGAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAATGCAACCAGA
 CTTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTCTCTTCCCACTTT
 TGATTCATTAATATTAAGTGTGCTGCTTTAAATGATGATGGATTGGATAATCATACTATA
 CTGCTCTACTACTCAACTGCTGCTTCTAGCTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTCAT
 TGTTTACATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTCCATCTGTCTGTAAAGGAAATTAAGC
 CCTGTGTTTTCTTTATTGTAGTGCTCATTGCTTGTACCATTACAAAGAAACGTTATTGA
 AAAATGCTCTTGTTACTACT

NA

Аминокислотный сиквенс NA

MLPSTIQTLTLFLTSGGVLLSLYVSASLSYLLYS DILLKFSPTKITAPTMSLDCANVSNVQAVNR
 SATKEMTFLLPEPEWYTPRLSCQGSTFQKALLISPHRFGETRGN SAPLIIREPFVACGPKECRHF
 ALTHYAAQPGGYNGTRKDRNKLRLHLSVKLGKIPTVENSIFHMAAWSGSACHDGREWYIG
 VDGPDSNALIKIKYGEAYTDYHSYANNILRTQESACNCIGGDCYLMITDGSASGISKCRFLKI
 REGRIIKEIFPTGRVEHTEECTCGFASNKTIECACRDNSYTAKRPFVKLVNVEDTAEIRLMCTET
 YLDTPRPDDGSITGPCESNGDKGLGGIKGGFVHQRMASKIGRWYSRTMSKTERMGMELYVK
 YDGDPTWSDALAPSGVMVSMKEPGWYSFGFEIKDKKCDVPCIGIEMVHDGGKETWHSAAAT
 AIYCLMGSQQLLWDTVTGVDMAL

Аминокислотный сиквенс NB

MNNATFNNTNPNPISHIRGSVIITICVSFTVILIVFGYITKIFTNKNNCTNNVIGLRERIKCSGCEP
 FCNKRDDISSPRAGVDIPSFILPGLNLSESTPN

Нуклеотидный сиквенс NA

AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTTAAAACCTGAAGCAAATAGGCCAAAAATGAACAATGCTA
 CCTTCAACTATAACAACGTTAACCCCTATTTCTCACATCAGGGGGAGTGTATTATCACTAT
 ATGTGTCAGCTTCACTGTCATACTTATTGTATTCGGATATATTACTAAAATTTTCACCAAC
 AAAAATAACTGCACCAACAATGTCATTGGATTGCGCGAACGTATCAAATGTTTCAGGCTGT
 GAACCGTTCTGCAACAAAAGAGATGACATTTCTTCTCCCAGAGCCGGAGTGGACATACCC
 TCGTTTATCTTGCCAGGGCTCAACCTTTCAGAAAGCACTCCTAATTAGCCCTCATAGGTTT
 GGAGAAACCAGAGGAAACTCAGCTCCCTTGATAATAAGGGAACCCCTTGTGTGCTTGTGGA
 CCAAAGGAATGCAGACACTTTGCTCTAACCCATTATGCAGCTCAACCAGGGGGATACTAC
 AATGGAACAAGAAAGGACAGAAACAAGCTGAGGCATCTGATTCAGTCAAATTAGGCAA
 AATCCCAACTGTAGAAAACCTCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGTGGGTCCGCATGCCA
 TGATGGTAGAGAATGGACATATATCGGAGTTGATGGCCCTGACAGTAATGCACTGATCAA
 AATAAAATATGGAGAAGCATATACTGACACATAACCATTCCCTATGCAAACAACATCCTAAG
 AACACAAGAAAGTGCCTGCAATTGCATCGGGGGAGATTGTTATCTTATGATAACTGATGG
 CTCAGCTTCAGGAATTAGTAAATGCAGATTTCTTAAAATTCGAGAGGGTTCGAATAATAAA
 AGAAATATTTCCAACAGGAAGAGTAGAGCATACTGAAGAATGCACATGCGGGTTCCGCA
 GCAATAAAACCATAGAAATGTGCCTGTAGAGATAACAGTTACACAGCAAAAAGACCCTTTG
 TCAAATTAATGTGGAGACTGATACAGCTGAAATAAGATTGATGTGCACAGAGACTTATT
 TGGACACCCCCAGACCAGATGATGGAAGCATAACAGGGCCTTGCGAATCTAATGGGGAC
 AAAGGGCTTGGAGGCATCAAAGGAGGATTTGTCCATCAAAGAATGGCATCTAAGATTGG
 AAGATGGTACTCCCGAACGATGTCTAAAACCTGAAAGAATGGGGATGGAACCTGTATGTCA
 AGTATGATGGAGACCCATGGACTGACAGTGACGCCCTTGCTCCTAGTGGAGTAATGGTTT
 CAATGAAAGAACCTGGTTGGTATTCTTTTGGCTTCGAAATAAAAGATAAGAAATGTGATG
 TCCCCTGTATTGGGATAGAGATGGTACACGATGGTGGAAAAGAGACTTGGCACTCAGCAG
 CAACAGCCATTTACTGTTTGTGGGCTCAGGACAATTGCTATGGGACACTGTCACAGGTG
 TTAGATGGCTCTGTAATGGAGGAATGGTTGAATCTGTTCTAAACCCTTTGTTCCATTTT
 GTTTGAAAAATTTGTCCTTACTGGACTTAATTGTTTCTGAAAAATGCTCTTGTACTACT

Цветом выделены: желтым - стартовый кодон NA;

серым - стартовый кодон NB;

красным - стопкодон NB;

зеленым - стопкодон NA.

PB2Аминокислотный сиквенс

MTLAKIELLKQLLRDNEAKTVLKQTTVDQYNIIRKFNTSRIEKNPSLRMKWAMCSNFPLALTK
 GDMANRIPLEYKGIQLKTAEDIGTKGQMCSIAAVTWWNTYGPIGDTEGFVKVYESFFLRKM
 RLDNATWGRITFGPVERVRKRVLNPLTKEMPPDEASNVIMEILFPKEAGIPRESTWIHRELK
 KREKLGKGTMITPIVLA YMLERELVARRRFLPVAGATSAEFIEMLHCLQGENWRQIYHPGGNK
 LTESRSQSMIVACRKIIRSIVASNPLELAVEIANKTVIDTEPLKSCLAIDGGDVACDIIRAALG

QKIRQRQRFGRLELKRISGRGFKNDEEILIGNGTIQKIGIWDGEEEFHVRCGECRGILKSKMR
 MEKLLINSAKKEDMKDLIILCMVFSQDTRMFQGVGEINFLNRAGQLLSPMYQLQRYFLNRS
 NDLFDQWGYEESPKASELHGINGLMNASDYTLKGVVVTKNVIDDFSSTETEKVSITKNLSLIK
 RTGEVIMGANDVSELESQAQLMITYDTPKMWEMGTTKELVQNTYQWVLKNLVTLKAQFL
 GKEDMFQWDAFEAFESIIPQKMAGQYSGFARAVLKQMRDQEVMMKTDQFIKLLPFCFSPPKLR
 SNGEPYQFLKLMLKGGGENFIEVRKGSPLFSYNPQTEVLTICGRMMSLKGKIEDEERNRSMGN
 AVLAGFLVSGKYDPDLGDFKTIEELEKLPGEKANILLYQGKPVKVVKRKRYALSNDISQGI
 KRQRMTVESMGWALS

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAGATGACATTGGCTAAAATTGAATTGTTAAAACAACCTGT
 TAAGGGACAATGAAGCCAAAACGGTATTGAAACAAACAACGGTAGACCAATACAACATA
 ATAAGAAAATTCAATACATCAAGAATTGAAAAGAACCCTTCATTAAGGATGAAGTGGGC
 CATGTGTTCTAATTTTCCCTTGGCTCTGACCAAGGGTGATATGGCGAATAGAATCCCCTTG
 GAATACAAGGGAATACAACCTTAAAACAAATGCTGAAGACATAGGAACCAAGGTCAAAT
 GTGCTCAATAGCAGCAGTTACCTGGTGGAATACATACGGACCTATAGGAGATACTGAAGG
 GTTCGAAAAGGTCTACGAAAGCTTTTTTCTCAGAAAGATGAGACTTGACAATGCCACTTG
 GGGCCGAATAACTTTTGGCCCGGTTGAAAGAGTGAGAAAAAGGGTACTGCTAAACCCTCT
 CACCAAGGAAATGCCTCCAGATGAAGCGAGCAATGTGATAATGGAAATATTGTTCCCTAA
 AGAAGCAGGAATACCAAGAGAATCTACTTGGATACATAGGGAACCTGATAAAAGAAAAA
 GAGAAAAATTGAAAGGAACGATGATAACTCCCATTGTACTGGCGTACATGCTTGAGAGA
 GAACTGGTTGCCCGAAGAAGGTTCTGCCAGTGGCAGGAGCAACATCAGCTGAGTTCATA
 GAAATGCTACATTGCTTACAAGGTGAAAATTGGAGACAAATATATCACCCAGGAGGGAA
 TAACTAACTGAATCTAGATCTCAATCGATGATTGTAGCTTGTAGGAAAATAATCAGAAG
 ATCAATAGTCGCATCAAACCCACTAGAGCTAGCTGTAGAGATTGCAAACAAGACTGTGAT
 AGACTGAACCTTTAAAATCATGTCTGGCAGCCATAGACGGAGGTGATGTAGCCTGTGA
 CATAATAAGAGCTGCATTAGGACAAAAAATCAGACAAAGACAAAGATTTGGGAGGCTTG
 AACTAAAGAGAATATCAGGGAGAGGATTCAAAAATGATGAAGAGATATTAATCGGGAAC
 GGAACAATACAGAAGATTGGAATATGGGACGGAGAAGAGGAGTTCCATGTAAGATGTGG
 TGAATGCAGGGGGATATTA AAAAAGAGCAAAATGAGAATGGAAAACTACTGATAAATT
 CAGCCAAAAAGGAGGACATGAAAGATTTAATAATCTTGTGCATGGTATTTTCTCAAGACA
 CTAGGATGTTCCAAGGAGTGAGAGGAGAAATAAATTTTCTTAATCGAGCAGGCCAACTTT
 TATCCCAATGTACCAACTCCAACGGTATTTTTTGAATAGGAGCAATGACCTTTTTGATCA
 ATGGGGATATGAGGAATCACCCAAAGCAAGTGAACCTACATGGGATAAATGGATTAATGA
 ATGCATCTGACTATACGTTGAAAGGGGTTGTAGTAACAAAAAATGTGATTGATGACTTTA
 GTTCTACTGAAACAGAAAAAGTATCTATAACAAAAAATCTTAGTTTAATAAAAAGGACTG
 GGAAGTCATAATGGGGGCTAATGACGTAAGTGAATTAGAATCACAAGCACAGCTAATG
 ATAACATATGATACACCTAAGATGTGGGAGATGGGAACAACCAAGAAGACTGGTGCAAAA
 CACCTACCAATGGGTGCTTAAAAATTTAGTAACACTGAAGGCTCAGTTTCTTCTGGGAAA
 AGAAGACATGTTCCAATGGGATGCATTTGAAGCATTGAAAGCATAATCCCCCAGAAGAT
 GGCTGGCCAGTACAGTGGATTTGCAAGAGCAGTGCTCAAACAAATGAGAGACCAAGAGG
 TTATGAAAAGTACAGTTCATAAAGTTGTTGCCTTTCTGTTTCTCGCCACCAAAAATTAAG
 GAGCAATGGGGAGCCTTATCAATTCTTGAAGCTTATGTTGAAAGGAGGAGGGGAAAATTT
 CATCGAAGTAAGGAAAGGGTCCCCTCTATTCTCCTACAATCCACAAACAGAAGTCCTAAC
 TATATGCGGCAGAATGATGTCATTAAAAGGAAAAATTGAAGATGAAGAAAGGAATAGAT
 CAATGGGGAATGCAGTACTGGCAGGCTTTCTCGTTAGTGGCAAGTATGACCCGGATCTTG
 GAGATTTCAAACTATTGAGGAACTTAAAAGCTAAAACCGGGAGAAAAAGCAAACATC
 TTACTTTATCAAGGAAAGCCCGTTAAAGTAGTTAAAAGGAAAAGATATAGTGCTTTATCC
 AATGATATTTTACAAGGAATTAAGAGACAAAGAATGACAGTTGAGTCCATGGGGTGGGC
 CTTGAGCTAAATATAAATTTATCCATTAATTCATAAATACAATTGAGTGAAAAATGCTCGT
 GTTCTACTA

Аминокислотный сиквенс

MNINPYFLFIDVPIQAAISTTFPYTGVPPYSHGTGTGYTIDTVIRTHEYSNKGKQYISDVTGCAM
 VDPTNGPLPEDNEPSAYAQLDCVLEALDRMDEEHPGLFQAASQNAMEALMVTTVDKLTQGR
 QTFDWTVCRNQPAATALNTTITSFRLNDLNGADKGGVLPFCQDIIDSLDKPEMTFFSVKNIKK
 KLPAKNRKGFLIKRIPMKVKDRITRVEYIKRALSNTMTKDAERGKLRRAIATAGIQIRGFVL
 VVENLAKNICENLEQSGLPVGGNEKKAKLSNAVAKMLSNCPPGGISMTVTGDNTKWNECLN
 PRIFLAMTERITRDSPIWFRDFCSIAPVLSNKIARLGKGFMITSKTKRLKAQIPCPDLFNIPLERY
 NEETRAKLLKLPFFNEEGTASLSPGMMMGMFNMLSTVLGVAALGIKNIGNKEYLWDGLQS
 SDDFALFVNAKDEETCMEGINDFYRTCKLLGINMSKKKSYCNETGMFEFTSMFYRDGFVSNF
 AMELPSFGVAGVNESADMAIGMTIIKNNMINNGMPATAQTAIQLFIADYRYTYKCHRGD
 SKVEGKRMKIIKELWENTKGRDGLLVADGGPNIYNLRNLHIPEIVLKYNLMDPEYKGRLLHPQN
 PFVGHLSIEGIKEADITPAHGPVKKMDYDAVSGTHSWRTRKRNRSILNTDQRNMILEEQCYAKC
 CNLFEACFNSASYRKPVGQHSMLAMAHRLRMDARLDYESGRMSKDDFEKAMAHLGEIGYI

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAATCCTTATTTTCTCTTCATAGATGTACCCA
 TACAGGCAGCAATTTCAACAACATTCCCATACACCGGTGTTCCCCCTTATTCCCATGGAAC
 GGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTGATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAA
 AACAATACATTTCTGATGTTACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAATGGGCCATTAC
 CCGAAGATAATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTCTTGAGGCTTTGGATA
 GAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGCCATGGAAGCAC
 TAATGGTCACAACCTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGGCAGACTTTTGATTGGACAGTGT
 GCAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTGAACACAACAATAACCTCTTTTAGGTTGAATG
 ATTTGAATGGAGCCGACAAGGGTGGGTAGTACCCTTTTGCCAAGATATCATTGATTCATT
 GGACAAACCTGAAATGACTTTCTTCTCAGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGCTAA
 AACAGAAAGGGTTTCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGACAGAATAACCA
 GAGTGGAATACATCAAGAGAGCATTATCATTAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGA
 GGCAAGCTAAAAAGAAGAGCAATTGCCACCGCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATT
 AGTAGTTGAAAACCTGGCTAAAAATATCTGTGAAAATCTAGAACAAGTGGTTTGCCAGT
 AGGTGGAACGAGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTGGCCAAAATGCTCAGTA
 ACTGCCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGAATGAATGC
 TTAATCCAAGAATCTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCAGAGACAGCCCAATTTGG
 TTCCGGGATTTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTGTCTCCAATAAAATAGCCAGATTGGGAA
 AAGGGTTCATGATAACAAGCAAAAACAAAAGACTGAAGGCTCAAATACCTTGTCCCGAT
 CTGTTTAATATAACCATTAGAAAGATATAATGAAGAAACAAGGGCAAAATTGAAAAAGCT
 GAAACCATTTCTCAATGAAGAAGGAACGGCATCTTTGTCACCTGGGATGATGATGGGAAT
 GTTTAATATGCTATCTACCGTGTGGGAGTAGCCGCACTAGGGATCAAAAACATTGGAAA
 CAAAGAATACTTATGGGATGGACTGCAATCTTCTGATGATTTTGCTCTGTTTGTAAATGCA
 AAAGATGAAGAGACATGTATGGAAGGAATAAACGATTTTTACCGAACATGTAAGCTATTG
 GGAATAAACATGAGCAAAAAGAAAAGTTACTGTAATGAAACTGGAATGTTTGAATTTAC
 AAGCATGTTCTACAGAGATGGATTTGTATCTAATTTTGCAATGGAACCTCCTTCATTTGGA
 GTTGCTGGAGTAAATGAATCAGCAGATATGGCAATAGGAATGACAATAATAAAGAACAA
 TATGATCAACAATGGGATGGGTCCAGCAACAGCACAAACAGCCATACAATTATTCATAGC
 TGATTATAGATACACCTACAAATGCCACAGGGGAGATTCCAAAGTGGAAGGAAAGAGAA
 TGAAAATTATAAAGGAGCTATGGGAAAACACTAAAGGAAGAGATGGTCTGTTAGTAGCA
 GATGGTGGGCCTAACATTTACAATTTGAGAACTTGCATATCCCAGAAATAGTATTAAG
 TACAACCTAATGGACCCTGAATACAAAGGGCGGTTACTGCATCCTCAAAATCCCTTTGTA
 GGACATTTGTCTATTGAGGGCATCAAAGAGGCAGATATAACCCCAGCACATGGTCCAGTA
 AAGAAAATGGACTATGATGCGGTATCTGGAACCTCATAGTTGGAGAACCAAAAGGAACAG
 ATCTATACTAAACACTGATCAGAGGAACATGATTCTTGAGGAACAATGCTACGCTAAGTG
 TTGCAACCTTTTTGAGGCCTGTTTTAACAGTGCATCATACAGGAAACCAGTAGGTCAGCA
 CAGCATGCTTGAGGCTATGGCCACAGATTAAGAATGGATGCACGACTAGATTATGAATC

GATCCTTTGGGAAAGCACTAAGAGTAATATTCACCAAATGTTTGATGCATTATGTATTTGG
 AAATGCCCAATTGGAGGGGTTTAGTGCCGAATCTAGGAGACTTCTACTGTTAATTCAGGC
 ATTAAGGACAGAAAGGGCCCTTGGGTATTTGACTTAGAGGGAATGTATTCTGGAATAGA
 AGAATGTATTAGTAACAACCCTTGGGTAATACAGAGTGCATACTGGTTAATGAATGGTT
 GGGCTTTGAAAAAGAGGGAAGTAAAGTATTAGAATCAATAGATGAAATAATGGATGAA
 AAAGAAGAGCATAGCGCTCAATTTGGTACTATTTTGTTTCATTATGTATCTAAACATCCAA
 TAAAAGAATTGAGAATTA AAAATGCACGTGGTTCTACT

NP

Аминокислотный сиквенс

MSNMDIDGINTGTIDKTPEEITSGTSGATRPIIKPATLAPPSNKRTRNPSPERATTSSEADVGRRT
 QKKQTPTEIKKSVYNMVKLGEFYNQMMVKAGLNDMERNLIQNAHAVERILLAATDDKK
 TEFQKKKNARDVKEGKEEIDHNKTGGTFYKMRDDKIYFSPRITFLKEEVKTMYKTTMGS
 DGFSGLNHIMIGHSQMNDVCFQRSKALKRVGLDPSLISTFAGSTLPRRSGATGVAIKGGGTLV
 AEAIRFIGRAMADRGLLRDIRAKTAYEKILLNLKNKCSAPQQKALVDQVIGSRNPGIADIEDLT
 LLARSMVVVRPSVASKVVLPISIYAKIPQLGFNVEEYSVMGYEAMALYNMATPVSILRMGDN
 AKDKSQLFFMSCFGAA YEDLRVLSALTGTEFKPRSALKCKGFHVPKEQVEGMGAALMSIKL
 QFWAPMTRSGGNEVGGDGGSGQISCSPVFAVERPIALSQAVRRMLSMNIEGRDADVKNLL
 KMMNDSMAKKTNGNAFIGKMFQISDKNKTNPVEIPIKQTIPNFFFGRDTAEDYDDLDY

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGTGAACCTCAAGTACCAACAAAACTGAAAATCAAAAAT
 GTCCAACATGGATATTGACGGCATCAACACTGGAACAATTGACAAAACACCAGAAGAAA
 TAACTTCCGGAACCAAGTGGGGCAACCAGACCAATCATCAAACCAGCAACCCTTGCCCCAC
 CAAGCAACAACGAACCCGAAACCCATCCCCGGAAGGGCAACCACAAGCAGTGAAGCT
 GATGTCCGGAAGGAGAACCCAAAAGAAACAAACCCCGACAGAGATAAAGAAGAGCGTCT
 ACAATATGGTAGTGAACCTGGGTGAATTCTACAACCAGATGATGGTCAAAGCTGGACTCA
 ACGA

TGACATGGAGAGAAACCTAATCCAAAATGCACATGCTGTGGAAAGAATTCTATTGGCTGC
 TACTGATGACAAGAAAACCTGAATTCCAAAAGAAAAAGAATGCCAGAGATGTCAAAGAAG
 GGAAAGAAGAAATAGACCACAACAAAACAGGAGGCACCTTTTACAAGATGGTAAGAGAT
 GATAAAACCATCTACTTCAGCCCTATAAGAATTACCTTTTTAAAAGAAGAGGTGAAAACA
 ATGTACAAAACCAACCATGGGGAGTGATGGTTTCAGTGGACTAAATCACATCATGATTGGG
 CATTACAGATGAACGATGTCTGTTTCCAAAGATCAAAGGCACTAAAAGAGTTGGACTT
 GACCCTTCATTAATCAGTACTTTTGCAGGAAGCACACTCCCCAGAAGATCAGGTGCAACT
 GGTGTTGCGATCAAAGGAGGTGGAACCTTAGTGCGGAAGCCATTCGATTTATAGGAAGA
 GCAATGGCAGACAGAGGGCTATTGAGAGACATCAGAGCCAAGACGGCCTATGAAAAGAT
 TCTTCTGAATCTGAAAACAAGTGCTCTGCGCCCAACAAAAGGCTCTAGTTGATCAAGT
 GATCGGAAGTAGAAATCCAGGGATTGCAGACATAGAAGACCTAACCTGCTTGCCCGAA
 GCATGGTCGTTGTCAGGCCCTCTGTAGCGAGCAAAGTGGTGCTTCCATAAGCATTATGC
 TAAAATACCTCAACTAGGGTTCAATGTTGAAGAATACTCTATGGTTGGGTATGAAGCCAT
 GGCTCTTTATAATATGGCAACACCCGTTTCCATATTAAGAATGGGAGACAATGCAAAAAGA
 TAAATCACAATTATTCTTCATGTCTTGCTTCGGAGCTGCCTATGAAGACCTAAGAGTTTGT
 TCTGCACTAACAGGCACAGAATTCAAGCCTAGGTCAGCATTAAAGTGCAAGGGTTTCCAC
 GTTCCAGCAAAGGAGCAAGTGAAGGAATGGGGGCAGCTCTGATGTCCATCAAGCTCCA
 GTTTTGGGCTCCAATGACCAGATCTGGGGGGAATGAAGTAGGTGGAGACGGAGGGTCTG
 GTCAAATAAGTTGCAGCCCCGTGTTTGCAGTAGAAAGACCTATTGCTCTAAGCAAGCAAG
 CTGTAAGAAGAATGCTGTCAATGAATATTGAGGGACGTGATGCAGATGTCAAAGGAAAT
 СТАКТСААГАТГАТГААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТ
 ААГАААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТ
 СААГААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТТААТГАТ

TAT**TAA**AGCAACAAAATAGACACTATGGCTGTGACTGTTTCAGTACGTTTGGAAATGTGGG
TGTTTACTCTTATTGAAATAAATAAATGTAAAAAATGCTGTTGTTTCTACT

M

Аминокислотный сиквенс M1

MSLFGDTIAYLLSLTEDGEGKAELAELHCWFGGKEFDLDSALEWIKNKRCLTDIQKALIGAS
ICFLKPKDQERKRRFITEPLSGMGTTATKKKGLILAERKMRRCVSFHEAFEIAEGHESSALLYC
LMVMYLNPGNYSMQVKLGTLCALCEKQASHSHRAHSRAAKSSVPGVRREMQMVSAMNTA
KTMNGMGKGEDVQKLAEEQLSNIGVLRSLGASQKNGEGIAKDVMEVLKQSSMGNSALVKK
YL

Аминокислотный сиквенс BM2

MLEPFQILSICSFILSALHFMAWTIGHLNQIKRGVNLKIRIRNPNETINREVSILRHSYQKEIQA
KETMKEVLSDNMEILSDHIVVEGLSAEEIKMGETVLEVEELQ

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCACGCACCTTTCTTAAA**ATG**TCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACCTGCTTT
CACTAACAGAAGATGGAGAAGGCCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAATTACTGTTGGTTC
GGTGGGAAAGAATTTGACCTAGACTCTGCTTTGGAAATGGATAAAAAACAAAAGATGCCTA
ACTGATATACAAAAAGCACTAATTGGTGCTCTATATGCTTTTTAAAACCCAAAGACCAA
GAAAGAAAAAGAAGATTCATCACAGAGCCCCTGTCAGGAATGGGAACAACAGCAACAAA
GAAGAAAGGCCTAATTCTAGCTGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTAAGCTTTCATGAAG
CATTTGAAATAGCAGAAGGCCACGAAAGCTCAGCATTACTATATTGTCTTATGGTCATGT
ACCTGAACCCTGGAAACTATTCAATGCAAGTAAAAGTAAACTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCG
AAAAACAAGCATCACATTCACATAGAGCCCATAGCAGAGCAGCAAAATCTTCAGTGCCTG
GAGTGAGGCGAGAAATGCAGATGGTTTCAGCTATGAACACAGCAAAAAACAATGAATGGA
ATGGGGAAAGGAGAAGACGTCCAAAAACTGGCAGAAGAGCTGCAAAGCAACATTGGAGT
ATTGAGATCTCTGGGAGCAAGTCAAAGAATGGAGAAGGAATTGCCAAGGATGTGATGG
AAGTGCTAAAACAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCTCTTGTGAAGAAATACCTA**TA**ATGCT
CGAACCATTTTCAGATTCTTTCAATTTGTTCTTTCATTTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTT
GGACAATAGGGCATTGGAATCAAATAAAAAGAGGAGTAAACCTGAAAATACGAATAAGA
AATCCAAATAAAGAGACAATAAACAGAGAGGTATCAATTCTGAGACACAGTTACCAAAA
AGAAATCCAAGCCAAAGAAACAATGAAGGAAGTACTCTCTGACAACATGGAGATATTGA
GTGACCACATAGTAGTTGAGGGGCTTTCTGCTGAAGAGATAATAAAAATGGGTGAAACA
GTTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAG**TGA**ACCCAATTTTCATCATATTTCTTGCTATGCATTT
AAGCAAATTGTAATCAATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGCGTTGTTTCTACT

Цветом выделены: желтым - стартовый кодон 1-й рамки считывания (M1);

красным – стопкодон 2-й рамки считывания (BM2);

зеленым – стопкодон 1-й рамки считывания (M1);

серым – стартовый кодон 2-й рамки считывания (BM2).

NS

Аминокислотный сиквенс NS1

MADNMTTQIEVGPATNATINFEAGILECYERLSWQRALDYPGQDRNLNLRKLESRIKTH
NKSEPEKSRMSLEERKAIGVKMMKVLLFMNPSAGIEGFEPYSIKNSSTSNPCNCNWDYPTP
GKCLDDIEEPENVDDPTEIVLRDMNNKDARQKIKEEVNTQKEGKFRLLTIKRDINVLRLV
VNGTFLKHPNGYKSLSTLHRLNAYDQSGRLVAKLVATDDLTVEDEEDGHRILNSLFRFDEG
HSKPIRAAETA VGVLSQFGQERRLSPEEGDN

Аминокислотный сиквенс NS2

MADNMTTQIEWRMKKMAIGSSVTHSSSVLMKDIQSQFEQLKLRWESYPNLVKSADYHQRR
TIRLVTEELYLLSKRIDNLFHKTIVIANSSIIADMIVSLSLLETLYEMKDVVEVYSRQCL

Нуклеотидный сиквенс

AGCAGAAGCAGAGCATTTGTTTAGTCACTGGCAAACGAAAAAATGGCGGACAACATGAC
 CACAACASAAATTGAGGTGGGTCCGGGAGCAACCAATGCCACCATAAACTTTGAAGCAG
 GAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGCTTTCATGGCAAAGAGCCCTTGACTACCCTGGTCAAG
 ACCGCCTAAACAGACTAAAGAGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGACTCACAAACAAAAGT
 GAGCCTGAAAGTAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGAT
 GAAAGTGCTCCTATTTATGAATCCCTCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCATACAGTATA
 AAAAATTCCTCAACTAGCAACTGTCCAAACTGCAATTGGACCGATTACCTCCAACACCA
 GGAAAGTGCCTTGATGACATAGAAGAAGAACCGGAAAATGTTGATGACCAACTGAAAT
 AGTATTGAGGGACATGAACAACAAAGATGCAAGGCAAAAGATAAAGGAGGAAGTAAAC
 ACTCAGAAAGAAGGGAAGTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGTCC
 TTGAGAGTGTGGTAAACGGAACCTTCCTCAAGCACCCCTAATGGATACAAGTCCTTATCA
 ACTCTGCATAGATTGAATGCATATGACCAGAGTGGGAGGCTTGTGCTAAACTTGTGCT
 ACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATGGCCATCGGATCCTCAACTCACTCTTC
 GAGCGTTTTTGATGAAGGACATTCAAAGCCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTGGGAGTC
 TTATCCCAATTTGGTCAAGAGCGCCGATTATCACCAGAGGAGGGAGACAATTAGACTGGT
 TACGGAAGAACTTTATCTTTTAAGTAAAAGAATTGATGATAACATATTGTTCCACAAAAC
 AGTAATAGCTAACAGCTCCATAATAGCTGACATGATTGTATCATTATCATTATTGGAAAC
 ATTGTATGAAATGAAGGATGTGGTTGAAGTGTACAGCAGGCAGTGCTTGTAATTTAAAA
 TAAAAATCCTCTTGTTACTACT

Цветом выделены:

желтым – стартовый кодон 1-й и 2-й рамки считывания (NS1 и NS2);

красным - стопкодон 2-й рамки считывания (NS2);

голубым – последний кодон перед сайтом сплайсинга;

зеленым – стопкодон 1-й рамки считывания (NS1);

серым – начальный кодон в сайте сплайсинга (NS2).

Таблица В.11 – Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 86 аминокислотная позиция)

	51	60	70	80	90	100	110	120
Bon43	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCFNCTDLDV	ALGRP KCMGN	IPSAKVS VLH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mar59	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDMDV	ALGRP KCMGT	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Ban64	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Rus69	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Osa70	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Gif73	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Gum73	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK73	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Kan76	PTKSHFANLK	GTQTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Sin79	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Ore80	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Eng82	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALARP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
USS83	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Vic85	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
AA86	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Vic87	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem86	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	AFGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem89	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Nas89	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCMGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Nan96	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGT	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Bei97	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Nan97	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Sha97	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Aki01	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Haw01	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK0601	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK2201	L TKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK330	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Oma01	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Bri02	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK1351	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK1434	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mar02	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
NY02	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Teh02	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mal04	PTKSHFANLK	GT ETRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Oh105	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGN	IPSAEVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Bri08	PTKSHFANLK	GT ETRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGK	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Tex08	PTKSHFANLK	GT ETRGKLC	KCLNCTDLDV	ALGRP KCTGK	IPSAKVS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Yta88	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
HK89	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Pan90	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Hou91	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Hou92	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Sic92	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Bei93	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Hou93	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem93	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGT	IPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mie93	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Nan93	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Har94	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem95	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGI	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Ala96	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGI	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Flo96	PTKSHFANLK	GT KTTGKLC	NCLNCTDLDV	ALGRP MCIGI	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem96	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Nas96	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGT	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem10	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGV	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Mem12	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGV	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Yshi98	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGV	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR
Joh99	PTKSHFANLK	GT KTRGKLC	TCLNCTDLDV	ALGRP MCVGI	TPSAKAS ILH	EVKPVTS	GCF	PIMHDRTKIR

Продолжение таблицы В.11

Sic99	PTKSHFANLK	GT K TRGKLCF	TCLNCTDLDV	ALGRP M CVGI	T PSAK A SILH	EVKPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Auc00	PTKSHFANLK	GT K TRGKLCF	TCLNCTDLDV	ALGSP M CVGI	T PSAK A SILH	EVRPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Mex00	PTKSHFANLK	GT K TRGKLCF	TCLNCTDLDV	ALGRP M CVGI	T PSAK A SILH	EVRPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Vic00	PTKSHFANLK	GT K TRGKLCF	TCLNCTDLDV	ALGRP M CVGI	T PSAK A SILH	EVKPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Sha02	PIKSHFANLK	G T RTRGKLCF	DCLNCTDLDV	ALGRP M CVGT	T PSAK A SILH	EVRPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Jil03	PTKSYFANLK	G T RTRGKLCF	DCLNCTDLDV	ALGRP M CVGT	T PSAK A SILH	EVRPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Flo04	PTKSYFANLK	G T RTRGKLCF	DCLNCTDLDV	ALGRP M CVGT	T PSAK A SILH	EVRPVTS G CF	PIMH D RTKIR
Flo06	PTKSYFANLK	G T RTRGKLCF	DCLNCTDLDV	ALGRP M CVGT	T PSAK A SILH	EVKPVTS G CF	PIMH D RTKIR

Таблица В.12 – Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 163 аминокислотная позиция)

	131	140	150	160	170	180	190	200
Bon43	N IRL S T S NVI	S AETAPGGPY	K IGTSGSCP N	V T N G S GFFET	MAWAV P K. . .	N KTAM N P V T V	E VPYIC A K G E	
Mar59	N IRL S T R NVI	N AETAPGGPY	T VG T S G SCP N	V T N G K GFFET	MAWAV P K N . K	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Ban64	N IRL S A R NVI	N AETAPGGPY	I VG T S G SCP S	V T N G K GFFAT	MAWAV P K N . K	N KTAT S P L T V	E VPYIC T K G E	
Rus69	N IRL S T R NVI	N AETAPGGPY	T VG T S G SCP N	V T N G K GFFET	MAWAV P K N . K	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Osa70	N IRL S A R NVI	N TETAPGGPY	I VG T S G SCP N	V T N G K GFFAT	MAWAV P K N . . .	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Gif73	H IRL S A R N V T	N AETAPGGPY	I VG T S R SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N . . .	K TAT N P L T V	E IPYIC T K G E	
Gum73	H IRL S A R N V T	N AETAPGGPY	I VG T S R SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N . . .	K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
HK73	N IRL S A R N V T	N AETAPGGPY	I VG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N . K	. . . T AT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Kan76	N IRL S T R NVI	N AETAPGGPY	I IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N . . .	N KTAT N P L T V	E VPYIC I K G E	
Sin79	N IRL S T R NVI	N AERAPGGPY	I IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K D . . .	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Ore80	N IRL S T R NVI	N AERAPGGPY	I IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K D . . .	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Eng82	N IKL S T R NVI	N AERAPGGPY	I IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K D . . .	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
US83	N IRL S T R NVI	N AETAPGGPY	I IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K D . . .	N KTAT D P L T I	E VPYIC T K G E	
Vic85	N IRL S T H NVI	N AETAPGGPY	I VG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N N	N KTAT N P L T V	E VP F I C T E G E	
AA86	N IRL S T H NVI	N A E A P GGPY	I VG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N N	N KTAT N P L T V	E VP F I C T E G E	
Vic87	H IRL S T H NVI	N AETAPGGPY	K VG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N P L T V	E VPYIC T E G E	
Mem86	N IRL S T H NVI	N AETAPGGPY	I VG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N N	N KTAT N P L T V	E VP F I C T E G E	
Mem89	K IG T S G SCP N	N IRL S T H NVI	N AETAPGGPY	I T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N P L T V	E VPYIC T E G E	
Nas89	R IG T S G SCP N	N IRL S T H NVI	N AETAPGGPY	I T N G N GFFST	MAWAV P K N D	N KTAT N P L T V	E VPYIC T E G E	
Nan96	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T V	E VPYIC T E G E	
Bei97	H IRL S I H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFV T	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Nan97	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Sha97	H IRL S I H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Aki01	R IRL S N H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Haw01	R IRL S N H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
HK0601	R IRL S N H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
HK2201	R IRL S N H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
HK330	R IRL S N H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Oma01	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Bri02	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
HK1351	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
HK1434	R IRL S N H NVI	N A E E A PGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N E N	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Mar02	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
NY02	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Teh02	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D . . .	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Mal04	H IRL S T H NVI	N A E N A PGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Ohi05	H IRL S T H NVI	N AEKAPGGPY	K IG T S G SCP N	V T N G N GFFAT	MAWAV P K N D	N KTAT N S L T I	E VPYIC T E G E	
Bri08	H IRL S T H NVI	N A E N A PGGPY	K IG T S G SCP N	I T N G N GFFAT	MAWAV P K N D K	N KTAT N P L T V	E VPYIC T E G E	
Tex08	H IRL S T H NVI	N A E N A PGGPY	K IG T S G SCP N	I T N G N GFFAT	MAWAV P K N D K	N KTAT N P L T V	E VPYIC T E G E	
Yta88	N IRL S T H NVI	N AERAPGGPY	R L G T S GSCP N	V T S R N GFFAT	MAWAV P R. D N	. K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
HK89	N IRL S T Q NVI	N AERAPGGPY	R L G T S GSCP N	V T S R D GFFAT	MAWAV P R. D N	. K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Pan90	N IRL S T Q NVI	N AERAPGGPY	R L G T S GSCP N	V T S R D GFFAT	MAWAV P R. D N	. K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Hou91	H IRL S T H NVI	N AERAPGGPY	R L G T S GSCP N	V T S K S GFFAT	MAWAV P R. D N	. K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Hou92	H IRL S T H NVI	N AERAPGGPY	R L G T S GSCP N	V T S R S GFFAT	MAWAV P K. D N	. K TAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Sic98	K IRL S T Q NVI	N AEKAPGGPY	R L G T S ESCP N	A T S R S GFFAT	MAWAV P R. D N	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	
Bei93	N IRL S T Q NVI	N AEKAPGGPY	R L G T S GSCP N	A T S R S GFFAT	MAWAV P R. D N	N KTAT N P L T V	E VPYIC T K G E	

Продолжение Таблицы В.12

Hou93	H IRLST HN VI	NAERAPGGPY	RLGTS G SCP N	VT SRS GF FAT	MAWAV PK . DN	.KTAT N PL T V	EV P YI CT K G E
Mem93	H IRLST HN VI	NAERAPGGPY	RLGTS G SCP N	VT SRS GF FAT	MAWAV PK . DN	.KTAT N PL T V	EV P YI CT K G E
Mie93	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	KL G TS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P YI CT K G E
Nan93	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	TT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P YI CT N G E
Har94	N IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DD	NKTAT N PL T V	EV P Y V CT E G E
Mem95	H IRLST HN VI	NAERAPGGPY	RLGTS G SCP N	VT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	.KTAT N PL T V	EV P YI CT K G E
Ala96	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P YI CT K E E
Flo96	H IRLST HN VI	NAERAPGGPY	RLGTS G SCP N	VT SRS GF FAT	MAWAV PR . .D	NKTAT N PL T V	EV P YI CT K G E
Mem96	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P YI CT K E E
Nas96	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P YI CT K E E
Mem10	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Mem12	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Yshi98	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PK . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Joh99	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Sic99	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Auc00	K IRLST QN VI	N IEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT SRS GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Mex00	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Vic00	K IRLST QN VI	NAEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PR . DN	NKTAT N PL T V	EV P H I CT K E E
Sha02	N IRLST QN VI	D AEK A LG P Y	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PK . DN	N K N AT N PL T V	EV P YI CT E G E
Jil03	N IRLST QN VI	D AENAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PK . DN	N K N AT N PL T V	EV P Y V CT E G E
Flo04	N IRLST QN VI	D AEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PK . DN	N K N AT N PL T V	EV P YI CT E G E
Flo06	N IRLST QN VI	D AEKAPGGPY	RLGTS G SCP N	AT S K S GF FAT	MAWAV PK . DN	N K N AT N PL T V	EV P YI CT E G E

Таблица В.13 – Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусов гриппа В, полученных из баз данных (выделена 224 аминокислотная позиция)

	191	200	210	220	230	240	250	260
Bon43	EV P YI CA K G E	DQITVWGFHS	D S ET Q M G RL Y	GDS K P Q K F T S	Y ANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L P Q S G R	
Mar59	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D ET L M V I L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L P Q S G R	
Ban64	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D S EA Q M V T L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L Q Q S G R	
Rus69	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D ET Q M V I L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L P Q S G R	
Osa70	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D KT Q M V T L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L P Q S G R	
Gif73	E I PYI CT K G E	DQITVWGFHS	D N ET Q M V N L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q A	E D E G L P Q S G R	
Gum73	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q A	E D E G L P Q S G R	
HK73	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q A	E D E G L P Q S G R	
Kan76	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D E G L P Q S G R	
Sin79	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D T ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Ore80	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EA Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Eng82	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N AI Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
USS83	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N KN Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Vic85	EV P F I CT E G E	DQITVWGFHS	D S ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P K Q A	E D G G L P Q S G R	
AA86	EV P F I CT E G E	DQITVWGFHS	D N E I Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P K Q A	E D G G L P Q S G R	
Vic87	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EA Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q A	E D G G L P Q S G R	
Mem86	EV P F I CT E G E	DQITVWGFHS	D N E I Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P K Q A	E D G G L P Q S G R	
Mem89	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D D ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T A H Y V	SQIGGF P N Q A	E D G G L P Q S G R	
Nas89	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N ET Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T A H Y V	SQIGGF P N Q A	E D G G L P Q S G R	
Nan96	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EN Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q A	E D G G L P Q S G R	
Bei97	EV P YI CT E G E	DQITVWGFHS	D T ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Nan97	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N E I Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Sha97	EV P YI CT E G E	DQITVWGFHS	D N EN Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Aki01	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EA Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Haw01	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N E I Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
HK0601	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EN Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
HK2201	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N E I Q M V K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q I	E D G G L P Q S G R	
HK330	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D S ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Oma01	EV P YI CT E G E	DQITVWGFHS	D N ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Bri02	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D N EA Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
HK1351	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D K ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
HK1434	EV P YI CT K G E	DQITVWGFHS	D S ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	
Mar02	EV P YI CT E G E	DQITVWGFHS	D N ET Q M A K L Y	GDS K P Q K F T S	SANGV T TH Y V	SQIGGF P N Q T	E D G G L P Q S G R	

Продолжение Таблицы В.13

NY02	EVPYICT TE GE	DQITVWGFHS	DNETQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Teh02	EVPYICT TE GE	DQITVWGFHS	DNEIQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Mal04	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNEAQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Ohl05	EVPYICT TE GE	DQIT I WGFHS	DSETQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Bri08	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNETQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Tex08	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNENQMAK LY	GDS KP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Yta88	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIG DF PNQT	EDGGLPQSGR
HK89	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DSKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Pan90	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Hou91	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Hou92	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Sic92	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKNQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Bei93	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKIQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Hou93	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Mem93	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Mie93	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Nan93	EVPYICT N GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Har94	EVPY VCTE GE	DQITVWGFHS	DNKAQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Mem95	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIGGF PN QT	EDGGLPQSGR
Ala96	EVPYICT K EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Flo96	EVPYICT K GE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIG DF PNQT	EDGGLPQSGR
Mem96	EVPYICT K EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Nas96	EVPYICT K EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Mem10	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Mem12	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Yshi98	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Joh99	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Sic99	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Auc00	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DNKAQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Mex00	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DNKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Vic00	EVP HICTK EE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANG I THYV	SQIGGF PE QT	EDGGLPQSGR
Sha02	EVPYICT TE GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Jil03	EVPY VCTE GE	DQITVWGFHS	DNKTPMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PA QT	EDGGLPQSGR
Flo04	EVPYICT TE GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGF PD QT	EDGGLPQSGR
Flo06	EVPYICT TE GE	DQITVWGFHS	DDKTQMKN LY	GDS NP QKFTS	SANGVTTHYV	SQIG SF PDQT	EDGGLPQSGR