

10. Мещерякова А.К., Костинов М.П., Магаршак О.О., Гусева Т.С., Паршина О.В. Влияние препарата рекомбинантного интерферона α -2b в форме геля на течение ОРВИ и состояние мукозального иммунитета у женщин в периоде гестации от 14 недель. Вестник оториноларингологии. 2014, 6: 50-53.
11. Севостьянова О.Ю., Теплова С.Н., Радзинский В.Е. Иммунный гомеостаз в динамике неосложненной беременности. Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология. 2005, 4 (32): 39-42.
12. Смирнова Т.Л., Портнова Е.В., Сергеева В.Е. Иммуниет и беременность. Вестник Чувашского университета. 2009, 2: 79-85.
13. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности. М., МИА, 2010.
14. Феликсова Л., Шебекова В., Целипанова Е. и др. Гриппферон у детей, больных ОРВИ. Врач. 2001, 1: 40-41.
15. Шумилов В.И., Шевцов В.А., Лобов С.П. Грипп и ОРВИ: неспецифическая профилактика с использованием генно-инженерного- α 2 интерферона и его новых форм. Лечащий врач. 2000, 9: 20-21.
16. Kneuber M.C., Moll H.A., de Groot R. Treatment and prevention of respiratory virus infection. Eur. J. Pediatr. 2000, 159 (6): 399-411.
17. Romero R., Chaiworapongsa T., Gotsch F. et al. The diagnosis and management of preterm labor with intact membranes. Clin. Maternal. Fetal. Med. Online. 2012, 29. <http://clinicalmaternalfetalmedicineonline.com/>.

Поступила 19.09.16

Контактная информация: Костинов Михаил Петрович, д.м.н., проф., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-41-49

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.А.Ртищев, Р.Р.Минтаев, В.Ю.Кост, И.Б.Коптяева,
И.И.Акопова, К.В.Лисовская, С.Г.Маркушин*

ВКЛЮЧЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ РА-ГЕНА ПРИВОДИТ К АТТЕНУАЦИИ ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А/WSN/33

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Исследование возможности получения аттенуированных вариантов вируса гриппа с помощью включения специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативную последовательность РА-гена (концевую часть СООН-домена РА-гена) вирулентного штамма. *Материалы и методы.* В работе был использован вирулентный штамм вируса гриппа А/WSN/33. Включение сайт-специфических мутаций в РА-ген вирулентного штамма А/WSN/33 проводили с помощью двуступенчатой мутационной ПЦР. Клонирование осуществляли, используя GoldenGate реакцию. Использовали 8-плазмидную трансфекционную систему на основе вектора рНW2000. Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках штамма DH5 α . Трансфекцию делали при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) в кокультуре клеток 293Т и MDCK. *Результаты.* Показано, что трансфектанты, содержащие замену F658A в СООН-домене РА-гена, приобрели ts-фенотип и резко снизили способность к размножению в легких мышей. Включение замены F658A в СООН-домен РА-гена в комбинации с включением в геном вирулентного штамма ts-мутаций из генов ХА штаммов вируса гриппа приводило к получению трансфектантов, обладающих фенотипическими характеристиками, типичными для кандидатов в живые гриппозные вакцины. *Заключение.* Показана возможность получения аттенуированных вариантов вируса гриппа путем включения специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативную последовательность РА-гена.

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфические мутации, трансфектанты, аттенуация, PA-ген

*A.A.Rtischev, R.R.Mintaev, V.Yu.Kost, I.B.Koptyaeva,
I.I.Akopova, K.V.Lisovskaya, S.G.Markushin*

INCLUSION OF SITE-SPECIFIC MUTATIONS INTO CONSERVATIVE SEGMENTS OF PA-GENE RESULTS IN ATTENUATION OF VIRULENT INFLUENZA VIRUS STRAIN A/WSN/33

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study the possibility of obtaining attenuated variants of influenza virus by including specially selected site-specific mutations into a conservative sequence of PA-gene (terminal segment of COOH-domain of the PA-gene) of a virulent strain. *Materials and methods.* A/WSN/33 — a virulent strain of influenza virus was used in the study. Inclusion of site-specific mutations into PA-gene of the A/WSN/33 virulent strain was carried out using a two-step mutation PCR. Cloning was carried out using GoldenGate reaction. 8-plasmid transfection system based on pHW2000 vector was used. Transformation was carried out in rubidium competent bacterial cells of DH5 α strain. Transfection was done using Lipofectamine LTX (Invitrogen) reagent in a 293T and MDCK cells' co-culture. *Results.* Transfectants with F658A substitution in the COOH-domain of the PA-gene were shown to acquire ts-phenotype and sharply reduce the ability to reproduce in mice lungs. Introduction of F658A substitution into COOH-domain of the PA-gene in combination with introduction of ts-mutations from ca influenza virus strains into the genome of the virulent strain resulted in obtaining transfectants that have phenotypic characteristics typical for live influenza vaccine candidates. *Conclusion.* The ability to obtain attenuated variants of influenza viruses by introducing specially selected site-specific mutations into conservative sequence of the PA-gene is shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 45—53

Key words: influenza virus, site-specific mutations, transfectants, attenuation, PA-gene

ВВЕДЕНИЕ

Имеющийся к настоящему времени опыт применения холодоадаптированной (ХА) живой гриппозной вакцины в России и США показал, что этот препарат обладает наибольшей эффективностью при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей [1, 2]. Использование генно-инженерных технологий может поднять на новый уровень разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии. В последнее время большой интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход, предполагающий прямое включение аттенуирующих мутаций в геном вирулентного штамма вируса гриппа [3, 4, 6 — 13]. Данные литературы за последний период свидетельствуют о том, что подавляющее большинство исследователей при этом использует стандартный набор ts-мутаций из ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (PB1-ген: K391E, E581G, A661T; PB2-ген: N265S; NP-ген: D34G). Вместе с тем, по данным литературы использование данного набора не позволяет полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но даже и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа [13]. С целью решения данной проблемы в представленной работе предлагается еще один

методический подход — включение специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативные участки РА-гена вирулентного штамма вируса гриппа, а также использование этих мутаций в комбинации с сайт-специфическими мутациями из других генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов-доноров: А/Краснодар/101/35/35/59 (Н2N2); А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2); А/Энн Арбор/6/60 (Н2N2). Структурно-функциональные особенности РА-субъединицы полимеразного комплекса до настоящего времени изучены довольно поверхностно. Известно, что она содержит 2 больших домена: эндонуклеазный домен (аминокислотные остатки 1 — 197) и большой С-терминальный домен (аминокислотные остатки 257 — 716), который контактирует с первыми 15 аминокислотными остатками РВ1-субъединицы. Оба домена связаны линкером, состоящим из 60 аминокислотных остатков (197 — 257), образующих 3 спиральных сегмента. Линкерная область РА-субъединицы лежит на поверхности РВ1-субъединицы и является критической для сборки гетеродимера РВ1-РА и его импорта в клеточное ядро. Недавно было обнаружено, что линкерная область РА-белка является подходящим местом для включения сайт-специфических мутаций с целью конструирования новых живых гриппозных вакцин [3]. Мы со своей стороны попытались с той же целью использовать другую консервативную область РА-белка — концевую часть СООН-домена, где у ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 была обнаружена мутация F707L. С этой целью были сделаны аминокислотные замены в позициях 706 (W-A), 707 (F-L), 658 (F-A). В данной работе мы исследовали влияние этих мутаций на фенотипические маркеры вирулентного штамма А/WSN/33 при их включении в геном данного штамма одних или в комбинации с ts-мутациями, взятыми из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован вирулентный штамм вируса гриппа А/WSN/33 (Н1N1), полученный путем трансфекции из плазмид рНW2000, содержащих отдельные гены данного штамма. Восемью-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рНW2000 была любезно предоставлена доктором Вебстером (Мемфис, США).

Все использованные в работе вирусы и сайт-специфические мутанты поддерживали путем пассажей в 10 — 11-дневных куриных эмбрионах (КЭ). Активность репродукции вирусов гриппа при разной температуре инкубации оценивали по результатам титрования в КЭ, инкубированным при 34°C, 37°C, 38°C, 39°C и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures). $RCT_{39} = (\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 34^\circ\text{C} - \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 39^\circ\text{C})$. Вирусы считались температурочувствительными (ts-фенотип), если RCT₃₉ был более 5.0 lg ЭИД₅₀/0,2 мл.

В опытах по трансфекции использовали культуру клеток Т293 и линию клеток MDCK, полученную из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивались при 37°C в СО₂-инкубаторе. Клеточные культуры пассировались на среде МЕМ (ПанЭко, Москва), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки и гентамицин в количестве 1 мг на 450 мл среды.

Для генно-инженерных работ со штаммом А/WSN/33 (Н1N1) вируса гриппа использовалась 8-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рНW2000 [5]. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для

сборки вируса в клеточной культуре при трансфекции. Для накопления плазмид использовали штамм *Escherichia coli* DH5alpha.

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием. Вначале аллантаоисную жидкость осаждали в центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-14) при 6000 об/мин в течение 30 мин для осаждения клеточного дебриса. Вирус осаждали из надосадочной жидкости на высокоскоростной центрифуге Beckman J2-21 с использованием ротора JA-14 (14000 об/мин, 2,5 часа). Осадок вирионов ресуспендировали в буфере STE (10mM Tris-HCL, 100 mM NaCL, 1mM EDTA, pH 7.4) в гомогенизаторе Даунса.

Для последующей постановки ПЦР выделяли вирусную РНК при помощи набора для выделения РНК из плазмы и сыворотки крови (Лаборатория Изоген, Москва).

Обратную транскрипцию ставили отдельно от ПЦР при помощи ревертазы M-MuLV (СибЭнзим, Новосибирск). ПЦР ставили с высокоточной полимеразой Tersus (Евроген, Москва). Очистку полученных ПЦР-продуктов из легкоплавкой агарозы осуществляли при помощи набора фирмы Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США).

Мутагенез PA-гена проводился с помощью двуступенчатой мутационной ПЦР. Для очистки ПЦР продукта использовали Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (кат. № 0702). Клонирование проводили с помощью так называемой GoldenGate реакции (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>). Использовались рестриктаза Esp3 (BsmB1) (Fermentas/Thermo-Scientific, кат. № ERO451), буфер 10x Fermentas Tango, T4 ДНК лигаза (СибЭнзим, кат. № E319). Реакция проводилась в амплификаторе с программой 15 циклов по 5 минут при 37°C и 5 минут при 17°C. Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках штамма DH5α. Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом.

Секвенирование вставок в полученных плазидах проводилось фирмой «Евроген» на автоматическом секвенаторе MegaBACE-500.

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) либо в кокультуре клеток 293Т и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293Т.

Изучение att-фенотипа проводили по следующей методике: группы мышей весом 10 — 12 г (самки, по пять голов на группу) инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом анализируемыми вирусами (в дозе 50 мкл на мышью). Через 72 часа мышью усыпляли и извлекали легочную ткань, из которой готовили 10% суспензию в ступках с тертым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10% суспензии легких определяли в куриных эмбрионах и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трех независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием среднего квадратичного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы нами был исследован ts-фенотип у вариантов штамма A/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в PA-гене. Как видно из табл. 1, включение мутаций в концевую часть COOH-домена PA-гена в позиции 706 и 707 незначительно влияло на уровень размножения штамма A/WSN/33 в куриных эмбрионах при повышенной температуре. Однако ва-

риант штамма А/WSN/33 с сайт-специфической мутацией F658A в РА-гене снизил активность размножения в куриных эмбрионах при 38°C на 2.0 lg и больше, чем на 3.0 lg при 39°C. На следующем этапе работы был исследован ts-фенотип вариантов штамма А/WSN/33, имеющих ts-мутацию F658A в РА-гене в комбинации с сайт-специфическими мутациями в геноме из РВ1-гена различных штаммов вируса гриппа. Как видно из табл. 1, трансфектант №5, имеющий в геноме единичную мутацию I147Т из РВ1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, полностью потерял способность к размножению при 39°C. Трансфектант №4, имеющий в геноме ts-мутации из РВ1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, характеризовался значительным снижением

способности к размножению при 39°C. Далее мы исследовали ts-фенотип трансфектанта №6, унаследовавшего в геноме мутацию V591I из РВ1-гена штамма А/Ленинград/134/17/57 в сочетании с мутацией F658A в РА-гене. Как видно из табл. 1, данный трансфектант характеризовался незначительным изменением уровня репродукции при 39°C. Принимая во внимание тот факт, что большинство полученных трансфектантов, имеющих в РА-гене мутацию F658A, характеризовались недостаточной аттенуацией, мы включили в геном штамма А/WSN/33 дополнительную ts-мутацию, взятую из РВ2-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Полученные трансфектанты №7 и №8, имеющие в геноме сайт-специфические мутации из всех 3 генов, кодирующих белки полимеразного комплекса, обладали различным набором мутаций только в РВ1-гене. Трансфектант №7 унаследовал одну ts-мутацию (V591I) в РВ1-гене из генома ХА штамма А/Ленинград/134/17/57. Трансфектант №8 приобрел 3 мутации из РВ1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (К391Е, Е581G, Е457D). Как видно из табл. 1, трансфектант №7 показал незначительное изменение ts-фенотипа, в то время как трансфектант №8 полностью утратил способность к размножению при непермиссивных условиях.

При изучении весовых характеристик мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33, содержащими сайт-специфические мутации в генах, кодирующие белки полимеразного комплекса РВ1, РВ2 и РА, было установлено, что мыши, инфицированные исходным вирулентным

Таблица 1. Изучение ts- и att-фенотипа вариантов штамма вируса гриппа А/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

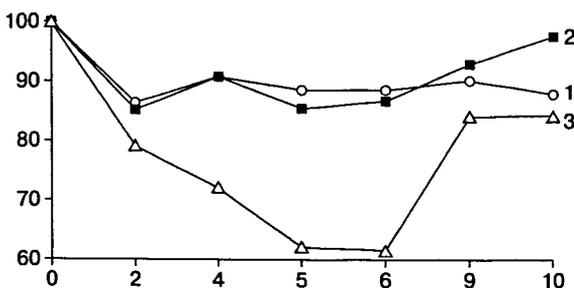
Исходный штамм и полученные трансфектанты (Тр.)	Титр вирусосодержащей жидкости в куриных эмбрионах (ЭИД ₅₀ /0,2 мл)			Титр вируса в легких мышей (lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл)
	34°C	38°C	39°C	
А/WSN/33	6.5±0.32	6.5±0.25	6,25±0,4	5,0±0,4
Тр. №1 РА* А/WSN/33** (W706A)***	5.5±0.4	5.5±0,2	н.д.	5.0±0.35
Тр. №2 РА А/WSN/33 (F707L)	6.0±0,25	н.д.	4.0±0,5	4.0±0,2
Тр. №3 РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±0,5	4.0±1.0	3.0±0,4	2.0±0,5
Тр. №4 РВ1 А/АА (К391Е, Е581G, Е457D) РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±0.5	4.0±1.0	2.0±0,2	2.0±0.7
Тр. №5 РВ1 А/Кр ₃₅ (I147Т) РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±1.0	4.0±0.8	<1.0	<1.0
Тр. №6 РВ1 А/Лен ₁₇ (V591I) РА А/WSN/33 (F658 А)	6.0±0.4	4.0±0.5	4.0±0.4	2.5±0.35
Тр. №7 РВ1 А/Лен ₁₇ (V591I) РВ2 А/Кр ₃₅ (V290L) РА А/WSN/33 (F658A)	6.5±0.5	5.0±1.0	3.0±0.5	2.5±1.2
Тр. №8 РВ1 А/АА(К391Е, Е581G, Е457D) РВ2 А/Кр ₃₅ (V290L) РА А/WSN/33 (F658A)	5.5±0.35	3.5±1.0	<1.0	<1.0

Примечание. * Полимеразный ген; ** название штамма: А/WSN/33, А/АА — А/Энн Арбор/6/60, А/Лен₁₇ — А/Ленинград/134/17/57, А/Кр₃₅ — А/Краснодар/101/35/59; *** Локализация мутации, н.д. — не делали.

штаммом А/WSN/33, характеризовались быстрой и значительной потерей веса после интраназального заражения в дозе $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/0,05 мл. На 8 — 9 сутки после инфицирования часть мышей погибла. Мыши, инфицированные трансфектантами №4, №5, №6, показывали различные, но менее выраженные темпы падения веса (рис.). Наибольшую потерю веса обнаружили мыши, инфицированные трансфектантом №6, имеющем в РВ1-гене мутацию V591I, унаследованную из РВ1-гена ХА штамма А/Ленинград/17/134/57. Мыши, инфицированные трансфектантами №7 и №8, показывали меньшую потерю веса на протяжении всего срока наблюдения. Можно было сделать вывод, что мутация V591I в РВ1-гене незначительно влияла на снижение вирулентности трансфектанта №6.

Далее изучали att-фенотип полученных сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33. Исследованные трансфектанты значительно различались по степени размножения в легочной ткани мышей. Как видно из табл. 1, среди трансфектантов, имеющих единичные замены в концевой области СООН-домена РА-гена, только трансфектант с мутацией F658A резко снизил уровень вирусного размножения в легочной ткани мышей. Трансфектанты, унаследовавшие мутации W706A и F707L в РА-гене, практически не отличались по вирулентности для мышей от исходного штамма А/WSN/33. Среди трансфектантов, имеющих ts-мутации в РВ1-гене и РА-гене, полной потерей размножения в легких мышей характеризовался только трансфектант №5, имеющий в РВ1-гене мутацию I147T от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Два другие трансфектанта демонстрировали сниженное, но заметное размножение вируса в легочной ткани мышей. В заключительной части этого раздела работы мы исследовали att-фенотип трансфектантов, имеющих ts-мутации в генах, кодирующих все три субъединицы полимеразного комплекса вируса гриппа. Как видно из табл. 1, трансфектанты №7 и №8 имели значительные различия по данному маркеру. Если трансфектант №8 потерял способность размножаться в легких мышей, то трансфектант №7 размножался в легких достаточно активно.

На следующем этапе работы нами был проведен сравнительный анализ



Потеря веса мышей, инфицированных вариантами вируса гриппа, имеющими сайт-специфические мутации в генах полимеразного комплекса.

По оси абсцисс — время (сут), прошедшее с момента инфицирования мышей сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33 вируса гриппа; по оси ординат — потеря веса мышей, инфицированных сайт-специфическими мутантами (%); 1 — Тр. № 4, 2 — Тр. № 5, 3 — Тр. № 6.

иммуногенности трансфектантов, имеющих сайт-специфические мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса. Необходимо было выяснить, могут ли эти варианты со сниженной способностью к размножению в легких мышей индуцировать достаточно высокий гуморальный иммунитет у мышей в ответ на интраназальное заражение. Наличие значительного титра антител в крови мышей, иммунизированных трансфектантами, дало бы возможность рассматривать их в качестве перспективных кандидатов в живые гриппозные вакцины. Трансфектанты №4, №5, №6, взятые для исследования,

имели общую мутацию F658A в PA-гене, однако различные мутации в PB1-гене. Как видно из табл. 2, трансфектанты №4, №5 и №6, имеющие соответственно три мутации (K391E, E581G, E457D) из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, одну мутацию из PB1-гена (I147T) штамма А/Краснодар/101/35/59 и ts-мутацию (V591I) из PB1-гена А/Ленинград/134/17/57, индуцировали умеренный уровень гуморального иммунитета у мышей. Мыши, иммунизированные трансфектантом №8, имеющим сайт-специфические мутации в 3 генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, также характеризовались умеренным уровнем гуморального иммунитета.

Таблица 2. Изучение иммуногенности вариантов штамма вируса гриппа А/WSN/33 с сайт-специфическими ts-мутациями в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

Сыворотка	Титр сывороточных антител в РЗГА при взаимодействии вирусов с антисыворотками*			
	Антигены			
	Тр. №4	Тр. №5	Тр. №6	Тр. №8
Тр. №4	1:160—1:320			
Тр. №5		1:160		
Тр. №6			1:160—1:320	
Тр. №8				1:320
Неим. сыв.	<:10	<:10	<:10	<:10

Примечание. * Реакцию задержки (торможения) гемагглютинации (РЗГА) с вирусами гриппа проводили согласно МУ 3.3.2. 1758-03. За титр сыворотки принимали предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации. Тр. — трансфектант.

В опытах на мышах нами была исследована защитная эффективность трансфектантов №4, №5, №6, №8. Мышей вакцинировали дважды интраназально исследуемыми вирусами в дозе $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/0,05мл с последующим инфицированием вирулентным штаммом А/WSN/33 в дозе $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/0,05 мл. Титр вирулентного штамма легких при заражении невакцинированных мышей составлял $10^{3.5}$ ЭИД₅₀/0,2 мл. В легких мышей, вакцинированных трансфектантами №4, №5, №6, №8, не наблюдалось вирусного размножения. Интересно отметить, что трансфектанты, индуцирующие умеренный уровень гуморальных антител (1:160 — 1:320), обеспечивали полную защитную эффективность при иммунизации, что, по-видимому, можно объяснить значительной активизацией в данном случае клеточного иммунитета.

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в практику получения гриппозных живых вакцин генно-инженерных подходов может значительно оптимизировать отдельные этапы этого процесса. В последнее время большой интерес вызывает генно-инженерный подход, предполагающий получение вакцинных вариантов путем прямого включения в геном вирулентных штаммов вируса гриппа заранее известных и изученных ts-мутаций, взятых из генома ХА штаммов — доноров аттенуации. Вместе с тем, не менее перспективным подходом в этом направлении может быть включение аттенуирующих мутаций в функционально важные сайты консервативных последовательностей генома вирулентного штамма. Примером может служить обнаружение в линкерной области PA-гена вирулентного штамма А/WSN/33 функционально важных сайтов, включение в которые мутационных замен приводило к появлению вакцинных вариантов [3]. Используя этот методический подход, мы включили мутационную замену F658A в другую функционально важный сайт PA-гена штамма А/WSN/33 — концевую область СООН-домена этого гена, что также привело к аттенуации этого штамма.

Как показали наши исследования, более глубокая аттенуация вирулент-

ного штамма А/WSN/33 может быть достигнута путем комбинированного включения в его PA-ген аттенуирующей замены F658A и ts-мутаций из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов вируса гриппа. Трансфектанты №5 и №8, содержащие замену F658A в PA-гене в сочетании с ts-мутациями из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов, имели удовлетворительные фенотипические характеристики. Они не размножались в куриных эмбрионах при непермиссивных условиях, полностью потеряли вирулентность для мышей при интраназальном заражении и обладали защитной эффективностью при заражении мышей вирулентным штаммом. Таким образом, использованный нами подход оказался весьма перспективным. Интересно отметить, что трансфектанты №5 и №8, индуцирующие у иммунизированных мышей умеренный уровень гуморальных антител, тем не менее, обладали удовлетворительной защитной эффективностью. В этой связи, можно предположить, что при интраназальной иммунизации полученными трансфектантами наблюдается значительная активация клеточного иммунитета.

По данным некоторых исследователей [6, 12] феномен констелляции генов значительно ограничивает включение мутаций в несколько различных генов вирулентного штамма с целью модификации его генома, что значительно усложняет использование данного генетического подхода для получения аттенуированных вариантов вируса гриппа А. Тем не менее, в данной работе показана возможность создания мутационных замен различного происхождения в 3 генах, кодирующих белки полимеразного комплекса вирулентного штамма. Исследование генетической стабильности полученных трансфектантов с оптимальными фенотипическими характеристиками даст возможность оценить их в качестве возможных кандидатов в живые гриппозные вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. Санкт-Петербург, Наука, 1994.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М. и др. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. Вопросы вирусологии. 2013, 1: 11-17.
3. Da Costa B., Sausset A., Munier S. et al. Temperature-sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation. *J. Virol.* 2015, 89 (12): 6376- 6390.
4. Hickman D., Hossain J., Song H. et al. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008, 89: 2682-2690.
5. Hoffmann E., Neumann G., Hobom G. et al. Ambisense approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology.* 2000, 267 (2): 310-317.
6. Jin H., Zhou H., Lu B. et al. 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. *J. Virol.* 2004, 78 (2): 995-998.
7. Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997, 71 (4): 2772-2778.
8. Pena L., Vincent A., Ye J. et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011, 85 (1): 456-469.
9. Solorzano A., Li Yo., Perez D.R. Alternative live — attenuated influenza vaccines based on modification in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010, 84 (9): 4587-4596.

10. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007, 81 (17): 9238–9248.
11. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type 7227PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature — sensitive and attenuating mutation. *J. Virol.* 1993, 67 (12): 7223–7227.
12. Subbarao K., Park E., Lawson C. et al. Sequential addition temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995, 69 (10): 5969–5977.
13. Zhou B., Li Y., Speer S. et al. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012, 30 (24): 3691–3702.

Поступила 26.09.16

Контактная информация: Ртишев Артем Андреевич,
115088, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.В.Шиповалов¹, А.Г.Дурыманов¹, О.В.Петрова¹, Е.В.Иванова²,
А.В.Епанчинцева¹, С.В.Святченко¹, С.В.Мальцев¹, В.Ю.Марченко¹,
В.Н.Михеев¹, А.Б.Рыжиков¹, Т.Н.Ильичева¹*

АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ГРИППУ НАКАНУНЕ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ СЕЗОНОВ В 2014 Г. И 2015 Г.

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область, ²Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск

Цель. Контроль за коллективным иммунитетом населения к сезонным вирусам гриппа, а также надзор за появлением в сыворотках крови людей антител к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом. *Материалы и методы.* Реакция торможения гемагглютинации с вакцинными и эпидемическими штаммами вируса гриппа, а также с высокопатогенными вирусами гриппа птиц А/гоок/Chany/32/2015 (H5N1) (clade 2.3.2.1c.) и А/Anhui/01/2013 (H7N9). *Результаты.* Среди всех образцов сыворотки, собранных осенью 2014 г. и осенью 2015 г., ни один не реагировал в РТГА с антигенами А(H5N1) и А(H7N9) даже в разведении 1:10. Из образцов, собранных осенью 2014 года, 41% были положительными к вирусу А/California/07/09(H1N1pdm09), 36% положительны к А/Texas/50/2012 (H3N2), 40% положительны к В/Brisbane/60/2008 (Vict.lin.) и 47% взаимодействовали в РТГА со штаммом В/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.). 22% всех образцов имели титр ниже 40 со всеми антигенами, и только 10% имели в РТГА титр 40 и более со всеми вакцинными штаммами. Среди образцов, собранных осенью 2015 года, количество серопозитивных к штамму А/California/07/09(H1N1pdm09) колебалось от 31% в Уральском ФО до 46% в Южном ФО. Количество серопозитивных к штамму А/Switzerland/9715293/13 (H3N2) было на уровне 4 — 13% во всех ФО, кроме Уральского, в котором этот показатель был немного выше 30%. Количество серопозитивных к вакцинным штаммам вируса гриппа В колебалось от 23 до 76%. Титр в РТГА равный или выше 40 со всеми вакцинными штаммами имели только 2% сывороток, серонегативными оказались 29% всех образцов. *Заключение.* Популяционный иммунитет населения России к вирусу гриппа А(H3N2) находится на очень низком уровне, поэтому социально значимые последствия от эпидемии гриппа во многом будут зависеть от кампании по вакцинации осенью 2016 года.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 53—60