

МЕХАНИЗМЫ АТТЕНУАЦИИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА А/КРАСНОДАР/101/35/59 (H2N2)

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

Цель. Изучение механизмов аттенуации холодоадаптированного (ХА) штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) вируса гриппа, связанных с нарушением функций белка NS1. *Материалы и методы.* Проведено изучение интерферогенной активности ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), его родительского варианта А/Краснодар/101/59 (H2N2), вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) и ряда одногенных и полигенных реассортантов между данными штаммами, полученных с помощью обратной генетики. Изучение динамики экспрессии гена ИФН β проводили с использованием методического подхода ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Было показано, что включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с реверсией к дикому типу не приводит к резкому изменению интерферогенной активности реассортанта. В то же время, аналогичное включение PB1-гена ХА штамма приводила к запредельному росту интерферогенной активности реассортанта. С другой стороны, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 NP-гена дикого штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) не отличалось по эффекту на интерферогенность реассортанта от включения NP-гена ХА штамма. *Заключение.* На формирование аттенуационного фенотипа реассортантов могут влиять как констелляция генов родительских вариантов, так и мутации, локализованных в этих генах. Полученные результаты позволяют предположить возможные механизмы аттенуации ХА штамма, связанных с нарушением функции NS гена.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 49—56

Ключевые слова: аттенуация, вирус гриппа, индукция интерферона, комплекс CPSF-30-NS1, белки полимеразного комплекса, мутации

S.G.Markushin, O.A.Svitich, A.R.Kinkulkina, I.B.Koptyaeva, K.V.Lisovskaya

MECHANISMS OF ATTENUATION OF COLD-ADAPTED STRAIN A/KRASNO-DAR/101/35/59 (H2N2)

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study of mechanisms of attenuation of cold-adapted (ca) influenza virus strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), associated with disruption of NS1 protein functions. *Materials and methods.* Study of interferonogenic activity of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), its parent variant A/Krasnodar/101/59 (H2N2), virulent strain A/WSN/33 (H1N1) and a number of single gene and multiple gene reassortants between these strains, obtained using reverse genetics, was carried out. Study of dynamics of IFN β gene expression was carried out by using a methodical approach of RT-PCR in real time mode. *Results.* Inclusion of PB-1 gene of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) with reversion to wild type into genome composition of virulent strain A/WSN/33 (H1N1) does not result in a sharp change of interferonogenic activity of the reassortant. At the same time, similar inclusion of PB-1 gene of ca strain resulted in an incredible growth of interferonogenic activity of the reassortant. On the other hand, inclusion of NP-gene of wild type strain A/Krasnodar/101/59 (H2N2) into genome composition of the wild type strain A/WSN/33 did not differ by effect on interferonogenicity of the reassortant from inclusion of NP-gene of ca strain. *Conclusion.* Both constellations of genes of parent variants and mutations localized in these genes could affect formation of attenuation phenotype of reassortants. The data obtained allow to assume possible mechanisms of attenuation of ca strains, associated with disruption of NS gene function.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 49—56

Key words: attenuation, influenza virus, interferon induction, CPSF-30-NS1 complex, polymerase complex proteins, mutations

ВВЕДЕНИЕ

NS-ген вируса гриппа А является главным фактором вирулентности данного вируса. Важнейшая функция NS1 белка заключается в подавлении индукции интерферонов I типа (ИФН α , ИФН β) в инфицированных клетках, что позволяет вирусу реплицироваться в клетках хозяина. NS1 белок подавляет индукцию интерферона двумя путями: во-первых, NS1 белок может маскировать вирусспецифическую РНК [14] и интерферировать с активацией рецептора Rig-1, вовлеченного в распознавание белков вируса гриппа [7, 9, 11]. Во-вторых, NS1 может связываться с клеточным белком CPSF 30, ответственным за процессинг клеточных мРНК и предотвращать ядерный экспорт вновь транскрибированных мРНК, включая мРНК, кодирующих ИФН β [10]. Было показано, что вирусный полимеразный комплекс является интегральным компонентом белкового комплекса CPSF 30-NS1 в инфицированных клетках и обеспечивает стабильность данного комплекса [12].

При анализе ts и att-фенотипа одногенных и полигенных реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [1, 2] и вирулентным штаммом А/WSN/33 с помощью обратной генетики, было обнаружено, что генетические детерминанты, ответственные за ts и att-фенотип ХА штамма, локализованы в PB1- и NS-генах [5, 6]. Однако сравнительное исследование нуклеотидной последовательности NS-гена ХА штамма и его родительского варианта А/Краснодар/101/59 (H2N2) показало отсутствие мутационных изменений в NS-гене ХА штамма. Можно было предположить, что родительский вариант А/Краснодар/101/59 изначально был частично аттенуирован. Тем не менее, исследование фенотипических характеристик штамма А/Краснодар/101/59 показало, что данный штамм хорошо размножался при повышенной температуре (38°C) и обладал вирулентностью для мышей при интраназальном заражении.

Принимая во внимание результаты исследований R.Krug et al. [12] можно было предположить, что мутации в белках полимеразного комплекса ХА штамма могли повлиять на активность NS1 белка данного штамма. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование влияния отдельных мутантных белков полимеразного комплекса ХА штамма на интерферогенную активность реассортантов для оценки сравнительного вклада констелляции генов и мутаций, локализованных в этих генах, в формирование аттенуационного фенотипа реассортантов. Исследование проводилось на модели одногенных и полигенных реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59, его родительским штаммом А/Краснодар/101/59 и вирулентным штаммом А/WSN/33.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) вируса гриппа [1, 2], исходный родительский штамм А/Краснодар/101/59 (H2N2), вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1), одногенные и полигенные реассортанты, полученные между ХА штаммом, родительским штаммом и вирулентным штаммом А/WSN/33 с помощью обратной генетики [5, 6]. Также в отдельных опытах использовали реассортант, унаследовавший PB1-ген от ХА штамма, с реверсией в данном гене и остальные гены от штамма А/WSN/33.

Конструировали 8 плазмид, содержащих отдельные гены штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). ХА штамм А /Краснодар/101/35/59(H2N2) был получен серийными пассажами исходного дикого штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) в куриных эмбрионах при постепенно снижающейся температуре. Восемь

сегментов кДНК ХА штамма были амплифицированы в ОТ-ПЦР из вирусспецифических геномных РНК со специфическими праймерами, содержащими рестрикционные сайты BsmB1. BsmB1 кДНК фрагменты были клонированы между двумя сайтами вектора pHW2000. Данный вектор был любезно предоставлен доктором Вебстером (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA). Все восемь плазмид были секвенированы, и нуклеотидные замены, возникшие случайно в процессе клонирования были удалены.

Двойная клеточная культура 293Т/MDCK была трансфецирована набором из 8 плазмид с применением Lipofectamine LTX & PLUS™ Reagent (Invitrogen) по ранее описанному методу [8]. Полученный вирус был затем пассирован в аллантоисной полости куриных эмбрионов при 33°C.

Инфекционные титры вируса были установлены в куриных эмбрионах при 34°C и 38°C через 48 часов после инкубации инфицированных куриных эмбрионов при данной температуре по методу Рида-Менча. Наличие вирусов в эмбрионах определяли с помощью реакции гемагглютинации с использованием 0,5% куриных эритроцитов. Разница в репродукции вируса при оптимальной и повышенной температуре оценивалась как проявление ts-фенотипа. Изучение att-фенотипа проводили по следующему методу: мыши были инфицированы интраназально под легким эфирным наркозом с титром вируса $10^{7.0}$ ЭИД₅₀/0,2 мл в объеме 50 мкл на мыш. Через 72 часа после инфекции у забитых мышей были извлечены легкие. Из легочной ткани готовили 10% суспензию, которую титровали в куриных эмбрионах и выражали в lg ЭИД₅₀/0,2 мл. Все вирусные штаммы и реассортанты были исследованы в 3 независимых экспериментах.

Для изучения интерферонотропности вирусов использовали суточный монослой фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки заражали вирусами с множественностью 0,1 ЭИД₅₀/клетку в объеме 0,2 мл. Адсорбцию проводили в течение 30 мин, затем в лунки добавляли среду MEM, содержащую трипсин (T 1426, Sigma) в концентрации 2 мкг/мл. Через 3 часа и через 6 часов после начала инфекции из лунок удаляли среду, клетки обрабатывали лизирующим буфером в объеме 200 мкл (ИЛС, РФ).

Для исследования экспрессии гена врожденного иммунитета ИФНβ из клеток проводили выделение РНК с использованием набора «РИБОсорб» (ИЛС, РФ) строго в соответствии с протоколом. Выделенную РНК хранили при температуре минус 70°C. Далее проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с использованием набора ОТ-1 (Синтол, РФ). Праймеры и зонды, используемые в реакциях ОТ-ПЦР, были подобраны к последовательностям мРНК (ИФНβ и GAP) с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой Синтол (РФ). Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали реакционную смесь, которую готовили из компонентов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green 1» (Синтол, РФ). ПЦР-РВ проводили в амплификаторе PikoReal™ 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США). Реакцию проводили при следующем температурном режиме: 95°C — 5 мин (94°C — 20 сек, 60°C — 40 сек) — 40 циклов [4]. Расчет данных проводился с помощью программного обеспечения, прилагаемого к прибору PikoReal™ 96. Данные по экспрессии генов представлены в десятичных логарифмах (относительно экспрессии гена GAP). Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы Microsoft Office Excel 2003. Для оценки достоверности различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различие показателей считалось достоверным при уровне значимости менее 0,05 [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальной стадии работы было проведено сравнительное изучение фенотипических характеристик родительских вариантов и отдельных реассортантов.

Характеристика ts и att-фенотипа одногенных и полигенных реассортантов между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентным штаммом А/WSN/33 (H1N1)

Вирусы	Генотип реассортантов									Титр вирусов, lg ЭИД ₅₀ /0,2мл		Титр вирусов в легких мышей, lg ЭИД ₅₀ /1 г легких
										34°C	38°C	
A/WSN/33	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,5±0,5	6,2±0,4	5,16±0,56	
A/KR (ДТ)	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,0±0,5	5,8±0,4	4,5±0,40	
A/KR ХА	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,2±0,5	<1,0	<1,0	
1	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,0±0,5	4,5±0,5	4,5±0,81	
2	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,5±0,32	1,5±0,4	2,0±0,70	
3	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,2±0,25	6,5±0,2	3,5±0,91	
4	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,7±0,74	6,0±0,8	5,0±0,50	
5	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	4,7±0,25	3,7±0,2	3,5±0,40	
6	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,5±0,4	<1,0	<1,0	
7	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,5±0,24	<1,0	2,0±0,40	
8	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,0±0,56	4,2±1,0	6,0±0,40	
9	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	6,0±0,5	1,0	2,0±1,10	
10	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,5±0,75	<1,0	<1,0	
11	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,0±1,0	3,7±0,7	4,75±0,24	
12	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,5±0,78	<1,0	<1,0	
13	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,5±0,75	<1,0	<1,0	
14	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,2±0,2	<1,0	<1,0	
15	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	5,5±0,75	<1,0	<1,0	

Как видно из табл., исходный родительский штамм А/Краснодар/101/59 (H2N2) одинаково хорошо размножался при оптимальной (34°C) и повышенной (38°C) температуре в куриных эмбрионах, а также активно реплицировался в легких мышей. Сходными фенотипическими характеристиками обладал вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1). С другой стороны, ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) хорошо размножался в куриных эмбрионах при 34°C и не размножался при повышенной температуре (38°C), и его репликация не наблюдалась в легких мышей. Включение генов ХА штамма в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) сопровождалось различными эффектами. Как видно из табл., включение единичных сегментов РНК ХА штамма, кодирующих белки PB1 или NS1/ NS2, приводило к появлению реассортантов, не способных к размножению при 38°C и утративших вирулентность для мышей. В то же время, при введении в геном вирулентного штамма А/WSN/33 генов ХА штамма, кодирующих мутантные белки PA, PB2 и NP, фенотипические признаки вирулентного штамма менялись незначительно. При изучении полигенных реассортантов было отмечено, что дополнительное включение генов ХА штамма в геном вирулентного штамма, в особенности генов, кодирующих белки PB1 и NS, приводило к более выраженному про-

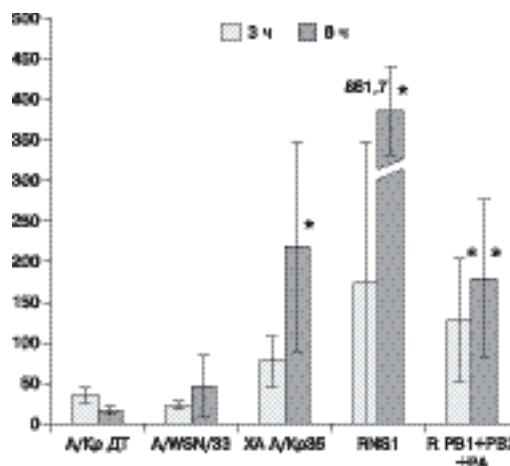


Рис. 1. Индукция экспрессии гена ИФНβ под действием различных штаммов вируса гриппа и реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33 (H1N1).

По оси абсцисс — штаммы вируса гриппа и реассортанты, по оси ординат — кол-во копий гена ИФНβ относительно 10³ копий гена GAP, * p<0,05 (здесь и на рис. 2, 3).

явлению аттенуационного фенотипа. С другой стороны, полигенный реассортант, содержащий PB2 и NP-гены от ХА штамма, а остальные гены от штамма А/WSN/33, характеризовался только умеренным изменением ts-фенотипа и активной репродукцией в легких мышей.

На следующем этапе работы мы попытались определить оптимальное время индукции ИФНβ в клетках, инфицируемых исследуемыми вирусами. Полученные нами данные показали, что в клетках ФЭЧ, инфицированных вирусом гриппа, индукция ИФНβ наблюдалась в диапазоне 3 — 6 часов после начала инфекции. Как видно из рис. 1, в клетках ФЭЧ, инфицированных диким штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2), наблюдалось заметное подавление индукции ИФНβ в указанном временном интервале. Аналогичная картина наблюдалась в клетках, инфицированных вирулентным штаммом А/WSN/33. Однако в клетках, инфицированных ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), наблюдалась значительная индукция ИФНβ. Количество копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP превышало 2×10^2 . Наивысший уровень индукции ИФНβ наблюдался в клетках, инфицированных реассортантом, геном которого содержал только NS-ген от ХА штамма, а остальные гены от штамма А/WSN/33 (детектируется около $8 \times 10^{2.0}$ копий относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP). Интересно отметить, что значительная активность ИФНβ наблюдалась в клетках, инфицированных реассортантом, геном которого включал гены, кодирующие белки полимеразного комплекса PB1, PB2, PA от ХА штамма, а остальные гены, включая NS-ген, от вирулентного штамма А/WSN/33. Отмечен синтез около $2 \times 10^{2.0}$ копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP. Этот факт подтверждает данные работы [12], свидетельствующие о том, что полимеразный комплекс вируса гриппа является интегральной частью белкового комплекса CPSF-30-NS1, ответственного за подавление индукции интерферона в инфицированных клетках.

На следующей стадии работы мы исследовали сравнительное влияние констелляции генов и мутаций, локализованных в этих генах, на формирование аттенуационного фенотипа реассортантов. Включение в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с мутацией в позиции 464 (U-C) приводила к запредельному росту интерферогенной активности в инфицированных клетках ($1,53 \times 10^{3.0}$ копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена (рис. 2)). В то же время, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с реверсией этой мутации не вызывало резкого изменения интерферогенной активности полученного реассортанта (рис. 3). С другой стороны, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) NP-гена штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) не отличалось по эффекту на интерферогенность реассортанта от включения NP-гена ХА штамма, со-

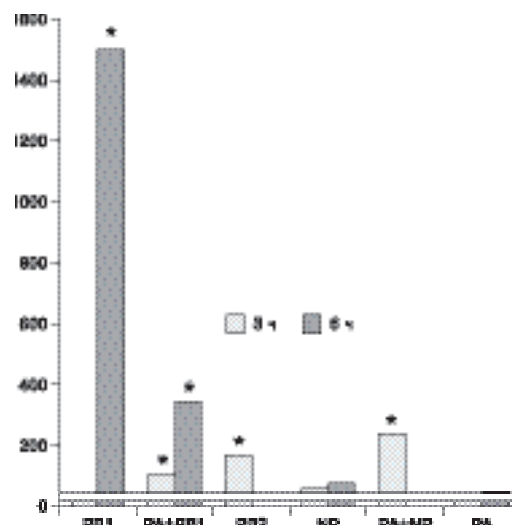


Рис. 2. Индукция экспрессии гена ИФНβ под действием различных реассортантов вируса гриппа, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33 (H1N1).

По оси абсцисс — реассортанты вируса гриппа, горизонтальная область по оси абсцисс — контрольное (фоновое) значение экспрессии гена ИФНβ в культуре (здесь и на рис. 3).

держашего мутацию А-У в позиции 1151 и мутацию С-У в позиции 1153 (рис. 2, 3).

Как видно из рис. 2, включение РА- и РВ2-генов ХА штамма в геном штамма А/WSN/33 либо незначительно влияло на эффективность подавления интерферогенной активности реассортантов, либо сопровождалось умеренной индукцией интерферона в инфицированных клетках. Дополнительное включение генов полимеразного комплекса ХА штамма в геном вирулентного штамма А/WSN/33 также могло приводить к противоположному эффекту. В частности, дополнительное включение РВ2-гена ХА штамма в геном реассортанта, уже имеющего NP-ген от ХА штамма, приводило к небольшому повышению индукции интерферона. В то время, как дополнительное включение РА-гена от ХА штамма в геном реассортанта, уже имеющего РВ1-ген от ХА штамма, вызывало резкое снижение индукции интерферона (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении изменчивости фенотипических признаков ХА реассортантов вируса гриппа — кандидатов в живые вакцины, полученных при скрещивании двух родительских вариантов, трудно отдифференцировать влияние констелляции генов от влияния мутаций, локализованных в этих генах. Как показали результаты наших экспериментов, в формировании фенотипа реассортантов свой вклад может вносить как констелляция генов, так и мутационные изменения в генах участников реассортации. При этом влияние мутаций, локализованных во внутренних генах донора аттенуации, на фенотип реассортанта может широко варьировать. Так, мутация в РВ1-гене ХА штамма в позиции 464 (U-C) могла изменить не только ts- и att-фенотип, но также значительно повысить интерферогенность полученного реассортанта.

Исследование интерферогенной активности NS1-белка вируса гриппа, проведенное R.Krug et al. [12], показало, что вирусспецифический полимеразный комплекс является интегральным компонентом белкового комплекса CPSF-30-NS1 в инфицированных клетках. Для стабилизации комплекса CPSF-30-NS1 необходимы родственные полимеразные белки РА и NP, но не РВ1 или РВ2 [12]. Полученные нами данные совпадают с данными R.Krug et al. Как видно из наших данных, включение белков NP и РА от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в геном вирулентного штамма А/WSN/33 не приводило к дестабилизации белкового комплекса CPSF-30-NS1, ответственного за подавление индукции интерферона в инфицированных клетках. Однако дополнительное включение в состав генома реассортантов мутантных полимеразных белков РВ2 и РВ1 от ХА штамма уже приводит к дестабилизации комплекса CPSF-30-NS1 и повышению индукции интерферона. Как нами было показано, наибольшая индукция интерферона наблюдалась в клетках, инфицированных штаммом А/WSN/33, в состав генома которого был включен мутантный полимеразный белок РВ1 от ХА штамма. Этот факт свидетельствует о том, что стабилизация комплекса CPSF-30-NS1 контро-

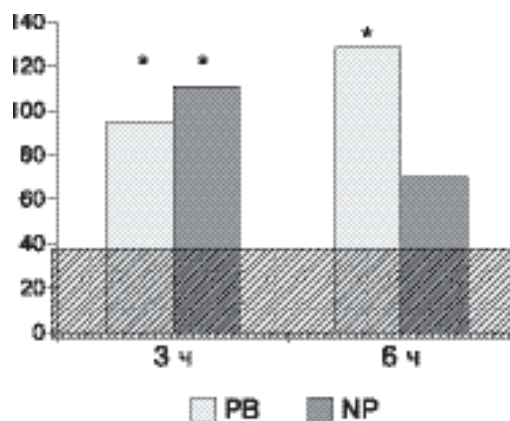


Рис. 3. Индукция экспрессии гена ИФβ под действием реассортанта между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), имеющего реверсию в РВ1-гене, и штаммом А/WSN/33, а также реассортанта между диким штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33.

По оси абсцисс — реассортанты вируса.

лируется не индивидуальными белками полимеразного комплекса, а единым комплексом, где отдельные белки тесно взаимодействуют друг с другом. Анализ интерферогенной активности исследуемых реассортантов указывает на отсутствие строгой корреляции между аттенуацией вируса и способностью вызывать индукцию интерферона. Так, исследованный нами полигенный реассортант, имеющий в составе генома гены NP и PB2 от ХА штамма, по ts- и att-фенотипу был близок к вирулентному штамму А/WSN/33, однако характеризовался умеренной индукцией интерферона.

Как сообщалось ранее [5, 6, 13], NS-ген ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) содержит ключевые детерминанты, ответственные за ts- и att-фенотип данного штамма, однако не имеет никаких мутационных изменений. Полученные нами данные позволяют объяснить этот феномен. Можно предположить, что в процессе длительных пассажей вируса при пониженной температуре в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, возник ряд кодирующих мутаций, изменивших структуру данных белков и превративших эти белки из «родственных» в «неродственные». Эти события могли нарушить контроль этих белков за стабильностью вирусспецифического комплекса CPSF-NS1, что привело к снижению способности ХА штамма ингибировать индукцию интерферона и утрате вирулентных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Аكوпова И.И. и др. Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) для получения штаммов живой интраназальной гриппозной вакцины. Патент РФ на изобретение № 2354695.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1999.
4. Свитич О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. и др. Аналитический подход в изучении противовирусного и иммуномодулирующего действия препаратов на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2013, 4: 377-384.
5. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г. и др. Генетические основы аттенуации холодоадаптированного штамма А(H2N2)/Краснодар/101/35/59-донора для живых гриппозных вакцин. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013а, 3 (70): 70-77.
6. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г. и др. Изучение att- фенотипа реассортантов между вирулентным штаммом вируса гриппа А(H1N1)/WSN/33 и вакцинным холодоадаптированным штаммом вируса гриппа А(H2N2)/Краснодар/101/35/59. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013b, 5 (72): 41-47.
7. Gack M.U., Albrecht R.A., Urano T. et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-1. *Cell Host Microbe*. 2009, 5: 439-449.
8. Hoffmann E., Krauss S., Perez D. et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002, 20: 3165-3170.
9. Mibayashi M., Martinez-Sobrido L., Loo Y.M. et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J. Virol*. 2007, 81: 514-524.
10. Noah D.L., Twu K.Y., Krug R.M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003, 307: 386-395.
11. Pichlmair A., Schulz O., Tan C.P. et al. RIG-1-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'- phosphates. *Science*. 2006, 314: 997-1001.

12. Rei-Lin Kuo, Krug R. M. Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. *J. Virol.* 2009, 83: 1611-1616.
13. Tsfasman T.M., Markushin S.G., Akopova I.I. et al. Molecular mechanisms of reversion to the ts+ phenotype of influenza a cold-adapted (ca)virus strain. *J. Gen. Virol.* 2007,88: 2724-2729.
14. Wang W., Krug R.M. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology.* 1996, 223: 41-50.

Поступила 15.07.15

Контактная информация: Маркушин Станислав Георгиевич,
115058, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.А.Жуков, С.В.Кокорев, С.В.Рогожкина, Д.Г.Мельников,
А.И.Терентьев, Е.А.Ковальчук, Е.Ю.Вахнов, С.В.Борисевич*

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ СОХРАНЯЕМОСТИ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЖИВОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ОСПЕННОЙ ВАКЦИНЫ (ТЭОВАК) В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ

48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад, Московская область

Цель. Определение величины коэффициентов термостабильности ТЭОВак для прогноза сохраняемости вакцины (специфической биологической активности) в процессе гарантийного срока хранения. *Материалы и методы.* ТЭОВак (таблетки жевательные) в первичной упаковке выдерживали при повышенной температуре (ускоренные и стресс-испытания) и в установленных ФСП на препарат условиях (долгосрочные испытания). Биологическую активность вакцины определяли титрованием на 12-суточных куриных эмбрионах. *Результаты.* Экспериментально установлена корреляция между величиной коэффициентов термостабильности и сохраняемостью приготовленных серий кондиционного препарата на конечный срок хранения. *Заключение.* Коэффициенты термостабильности могут быть использованы в качестве прогностического показателя качества производимой таблетированной лекарственной формы препарата для оценки сохраняемости вакцины в процессе гарантийного срока хранения.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 56—62

Ключевые слова: ТЭОВак, куриный эмбрион, активность, термостабильность, испытание, хранение

*V.A.Zhukov, S.V.Kokorev, S.V.Rogozhkina, D.G.Melnikov,
A.I.Terentiev, E.A.Kovalchuk, E.Yu.Vakhnov, S.V.Borisevich*

THERMAL STABILITY AS A PROGNOSTIC INDICATOR OF CONSERVATION OF LIVE EMBRYONIC SMALLPOX VACCINE (TEOVAC) DURING STORAGE

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russian Federation, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

Aim. Determination of values of coefficients of thermal stability of TEOVAc for prognosis of conservation of the vaccine (specific biological activity) during the process of warranty period storage. *Materials and methods.* TEOVAc (masticatory tablets) in primary packaging was kept at increased temperature (accelerated and stress-tests) and at the conditions established by PAP for the preparation (long-term tests). Biological activity of the vaccine was determined by titration on 12-day chicken embryos. *Results.* A correlation between the value of coefficients of thermal stability and conservation of the prepared series of the condition preparation at the final date of