

## **ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА А/WSN/33, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА PB2-ГЕНА**

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

*Цель.* Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма А/WSN/33(H1N1) вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена. *Материалы и методы.* С помощью методов обратной генетики получены сайт-специфические мутанты штамма А/WSN/33, имеющие в PB2-гене ts-мутации из генома холодоадаптированных (ХА) штаммов-доноров аттенуации: А/Энн Арбор/6/60(H2N2), А/Ленинград/134/17/57(H2N2), А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). У полученных сайт-специфических мутантов исследован ts-фенотип, att-фенотип, иммуногенность и защитная эффективность при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении. *Результаты.* Показано, что включение в PB2-ген вирулентного штамма А/WSN/33 как единичных ts-мутаций, так и комбинации ts-мутаций из генома известных ХА штаммов-доноров аттенуации ведет к изменению ts- и att-фенотипа полученных сайт-специфических мутантов. Наблюдалось падение способности к размножению при повышенной температуре и снижение вирулентности для мышей при интраназальном заражении. Полученные мутанты имели высокую защитную эффективность при гомологическом и гетерологическом контрольном заражении. *Заключение.* Полученные данные позволяют сделать вывод, что некоторые сайт-специфические мутанты не уступают по защитной эффективности как при гомологичном, так и гетерологичном контрольном заражении ХА реассортантным вакцинным вариантам. Результаты работы дают основания рассматривать некоторые из этих мутантов как возможные кандидаты в живые гриппозные вакцины.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 68—76

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфический мутагенез, ts-фенотип, att-фенотип, защитная эффективность, гомологичное и гетерологичное контрольное заражение, аттенуация

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

## **STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF ATTENUATED VARIANTS OF THE VIRULENT A/WSN/33 STRAIN OF INFLUENZA VIRUS, OBTAINED BY THE SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS OF PB2-GENE**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Study of biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene. *Materials and methods.* Site-specific mutants of A/WSN/33 of influenza virus, having in PB2- gene ts-mutations from genome of cold-adapted (CA) master-strains: A/Ann Arbor/6/60 (H2N2); A/Leningrad/134/17/57 (H2N2); A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) were obtained with help of reverse genetics methods. The ts-phenotype, att-phenotype, immunogenicity and protective efficacy in homologous and heterologous control infections were studied in the obtained site-specific mutants. *Results.* It was shown that the inclusion in the PB2-gene of the virulent A/WSN/33 strain as single mutations and a combination of mutations from the genomes of CA donor-strains leads to a change in the ts-phenotype and att-phenotype of the mutants obtained. These mutants had high protective efficacy in homologous and heterologous control infection. *Conclusion.* The results obtained allow us to consider the site-specific mutants of influenza virus as possible candidates for live influenza vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 68—76

Key words: influenza virus, site-specific mutagenesis, ts-phenotype, att-phenotype, protective efficacy, homologous and heterologous control infections, attenuation

## ВВЕДЕНИЕ

Многолетний опыт использования живых гриппозных вакцин в России и США показал их высокую эффективность. В настоящее время они успешно используются в виде холодоадаптированных (ХА) реассортантных вакцин при массовых иммунизациях, особенно детей [1]. В отличие от инактивированных гриппозных вакцин ХА гриппозные вакцины способны защищать население от дрейфовых вариантов вируса.

Прямое включение аттенуирующих мутаций в геном актуальных эпидемических штаммов можно рассматривать как новый перспективный подход к получению живых гриппозных вакцин [4, 7, 16, 17, 20]. Основным источником аттенуирующих мутаций, согласно данным литературы, рассматривается холодоадаптированный штамм А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) [10]. Однако использование набора мутаций из генома этого штамма не позволяло полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но также и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа человека [20]. Для успешного решения этой проблемы целесообразно расширение арсенала аттенуирующих мутаций. В этой связи, возможно использование охарактеризованных аттенуирующих мутаций, взятых из генома других ХА штаммов вируса гриппа человека, в частности, ХА штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [1] и ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [2].

Опыты, проведенные некоторыми исследователями [12, 18], показали высокую эффективность включения сайт-специфических мутаций в PB2-ген вирулентного штамма для получения аттенуированных вариантов вируса гриппа А. Применение этой технологии в отношении PB2-гена позволило включать в этот ген несколько аттенуирующих мутаций, что дало возможность контролировать степень аттенуации вирулентного штамма. Данные, полученные этими авторами, свидетельствовали также о высокой генетической стабильности некоторых из этих вариантов, полученных с помощью данной технологии. В данной работе мы попытались исследовать аттенуационный потенциал ts-мутаций, локализованных в PB2-гене всех вышеуказанных ХА штаммов после их прямого включения в различных комбинациях в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1, а также изучить иммуногенность и защитную эффективность полученных сайт-специфических мутантов при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении. в сравнении со сходными характеристиками ХА вакцинного реассортанта, имеющего поверхностные антигены, аналогичные поверхностным антигенам штамма А/WSN/33.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные литературы свидетельствовали о том, что генетические детерминанты, ответственные за ts-фенотип и att-фенотип ХА штаммов-доноров вируса гриппа А, могут быть локализованы в PB2 —гене [11,15, 19]. Более поздние исследования выявили конкретные аминокислотные замены в PB2-белке, ответственные за аттенуацию этих штаммов-доноров [8]. Как видно из табл. 1, ХА штамм А/Энн Арбор/6/60 имел аминокислотную замену в позиции 265 PB2-белка [3, 5, 9], ХА штамм А/Ленинград/134/17/57 — в позиции 478 PB2-белка [8] и ХА штамм А/Краснодар /101/35/59 — в позиции 290 PB2-белка [2]. Все аминокислотные замены являлись следствием замены в триplete одного нуклеотида. С помощью обратной генетики на первом этапе исследований в геном вирулентного штамма А/WSN/33 были включены одиночные мутации из PB2-гена ХА штаммов А/Энн Арбор/6/60, А/Ленинград/134/17/57 и А/Краснодар/101/35/59. Все полученные трансфектанты с единичными заменами в PB2 гене характеризовались резко выраженным снижением размножения в куриных эмбрионах при 39°C (shutoff температура). Последовательное включение дополнительных мутаций в геном вариантов с единичными мутациями приводило к получению двойных мутантов: AAL2 (265+478), AAK2 (265+290) и LAK2 (478+290). Дальнейшая работа в этом направлении позволила получить вариант с тремя ts-мутациями в PB2-гене: U2 (265+290+478).

Таблица 1. Нуклеотидные и аминокислотные замены, включенные с помощью сайт-специфического мутагенеза в PB2-ген вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1)

Исходный вирулентный штамм и трансфектанты	Нуклеотидные замены в указанном триплете и индуцированные аминокислотные замены					
	Позиция 265		Позиция 290		Позиция 478	
	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота
А/WSN/33	AAC	Asn	GUA	Val	GUA	Val
<b>Единичные мутанты</b>						
Тр. №12 А/ЭннАрбор/6/60 (Asn 265 Ser)	AGC	Ser	-	-	-	-
Тр. № 10 А/Краснодар /101/35/59 (Val 290 Leu)	-	-	UUA	Leu	-	-
Тр. №11 А/Ленинград /134/17/57 (Val 478 Leu)	-	-	-	-	UUA	Leu
<b>Двойные мутанты</b>						
Тр. № 13 (LAK2) (290+478)	-	-	UUA	Leu	UUA	Leu
Тр. №14 (AAK2) (265+ 290 )	AGC	Ser	UUA	Leu	-	-
Тр № 15 (AAL2) (265+ 478)	AGC	Ser	-	-	UUA	Leu
<b>Тройной мутант</b>						
Тр. №16 (U2) (265 +290+478)	AGC	Ser	UUA	Leu	UUA	Leu

Получение ХА реассортанта между штаммом А/WSN/33(H1N1) и ХА штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) проводили по ранее описанной стандартной методике [13]. Инактивацию генно-инженерного штамма А/WSN/33 проводили с помощью УФ-облучения (УФ-лампа G8W T5, Germicidal, 288 nm). В процессе инактивации титр вирусосодержащей жидкости снижался на 5,0 lg. Смешанную инфекцию штаммов А/WSN/33 и А/Краснодар/101/35/59 в куриных эмбрионах проводили при температуре 30°C в течение 18 часов. Далее проводили 2 селективных пассажа в куриных эмбрионах при 25°C в присутствии антисыворотки к штамму А/Краснодар/101/35/59. Полученный реассортант клонировали методом бляшек. Анализ генома ХА реассортанта проводили с помощью ПЦР с использованием дифференцирующих праймеров к штамму А/Краснодар/101/35/59. Были использованы следующие пары праймеров 5'—3': PB2-ген: F2-1 (CCCTGTCCATGTTAGAAACCAAGT), R2-1 (CGCTGAGTTGCCCTAGTAACGA), PB1-ген: F1-1 (AGCACAAGCAGGCAAACCAT), R2-1 (CAATCTGTGTGCTGTGG), PA-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGTACTGATC), R2 (TGGATGTGTGTCTTCTCAGA), NP-ген: F4-1 (GCCAGTGGGTACGACTTCGA), R2 (CTGATTTGACCTGCAGAG), M-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGTAGATATTG), R2 (TGCAAGATCCCAATGATACTC), NS-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGGTGAC), R1 (CCCATTCTCATTACTGCTTC). РЗГА с использованием антисывороток к серотипам Н1 и Н2 показала, что НА-белок ХА реассортанта относится к серотипу Н1 (антисыворотка к Н1- 1:1024, антисыворотка к Н2- 1:20). Секвенирование NA-гена ХА реассортанта показало его принадлежность к серотипу N1.

Вирулентный генно-инженерный штамм г А/WSN/33 (H1N1) был получен с помощью трансфекции из плазмид рНW2000 со вставками генов штамма А/WSN/33

(H1N1), предоставленных доктором Вебстером (Мемфис, США). Для проведения данной работы был также получен холодоадаптированный реассортант путем скрещивания ХА штамма А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) и вирулентного штамма вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Реассортант унаследовал 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора и 2 гена, кодирующих поверхностные HA и NA-белки от штамма А/WSN/33. При гомологичном контрольном заражении был использован вирулентный штамм А/WSN/33(H1N1). При гетерологичном контрольном заражении использовали штамм А/Утка Пенсильвания/10218/1984(H5N2) вируса гриппа птиц (H5N2), адаптированный к мышам [14].

Все использованные в работе вирусы и сайт-специфические мутанты поддерживали путем пассажей в 10 — 11-дневных куриных эмбрионах. 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 RCT<sub>39</sub> был более 5.0 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Температура, при которой размножение вируса снижалось в 100 раз по сравнению с оптимальной температурой размножения считалось shutoff температурой.

В опытах по трансфекции использовали культуру клеток T293 и линию клеток MDCK, полученную из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивались при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клеточные культуры пассировались на среде MEM (фирма 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 (H1N1) вируса гриппа использовалась 8-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рHW2000. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для сборки вируса в клеточной культуре при трансфекции [6]. Плаزمида рHW2000, а также плазмиды со вставками генов штамма вируса гриппа А/WSN/33 были предоставлены доктором Вебстером (Мемфис, США). Для накопления плазмид использовали штамм *Escherichia coli* DH5alpha.

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием. Вначале аллантоисную жидкость центрифугировали 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 (ООО «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 РВ2-гена проводился с помощью двуступенчатой ПЦР. На место введения мутации в последовательности гена подбирались прямой и обратный мутационные праймеры с необходимой заменой. Синтез олигонуклеотидов заказывался через компанию Евроген. Для контроля длины ПЦР продукта проводился аналитический фореуз в 1,5% агарозном геле с использованием трис-ацетатного буфера. Для очистки ПЦР продукта использовали Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (кат. № 0702).

Клонирование проводили с помощью так называемой GoldenGate реакции (web-site: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone0003647>). Использовались рестриктаза Esp3 (BsmB1) (Fermentas / ThermoScientific кат. № ERO451), буфер 10x Fermentas Tango, T4 ДНК лигаза (Сибэнзим, кат. № E319) до 5 ед/мкл, дитиотреитол (ДТТ) до 1мМ, АТФ до 1мМ и линейный вектор со вставкой по 50 нг (молярное соотношение вектор/вставка — 1/3). 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 DH5a. После разморозки во льду к клеткам добавлялась 1/2 часть лигазной смеси. Далее суспензию клеток инкубировали 1 час во льду, проводили тепловой шок — 2 минуты при 42°C в водяной бане, инкубировали во льду 2 минуты, добавляли среду LB без антибиотика и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Клетки высевались на чашки Петри с 1,5% агаром и средой LB с ампициллином (200 мкг/мл). Чашки Петри инкубировали 16 часов при 37°C. Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом.

Секвенирование вставок в полученных плазмидах 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 (плотность клеточного монослоя около 70%).

Изучение att-фенотипа проводили по следующей методике: группы самок мышей (по пять голов на группу) инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом анализируемыми вирусами с инфекционным титром  $10^{4.5}$  ЭИД<sub>50</sub> (в дозе 50 мкл на мышь). Через 72 часа мышей усыпляли и извлекали легочную ткань. Из легочной ткани готовили 10% суспензию в ступках с тертым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10 % суспензии легких определяли в куриных эмбрионах и выражали в lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трех независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием среднего квадратичного отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было проведено сравнительное исследование ts-фенотипа ХА реассортанта А/Краснодар/101/35/59 x А/WSN/33 и вариантов штамма А/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в PB2-гене. Как видно из табл. 2, родительские варианты: ХА штамм—донор А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1) значительно различались по ts-фенотипу. Штамм А/WSN/33 активно размножался в куриных эмбрионах как при 34°C, так и при 38°-39°C. При 39°C штамм А/WSN/33 крайне незначительно снижал репродуктивную активность. ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 активно реплицировался в куриных эмбрионах при 34°C, однако резко снижал темпы репродукции при 38°C и 39°C. ХА реассортант, полученный при скрещивании этих родительских вариантов, унаследовал от ХА штамма-донора высокую репродуктивную активность и, в отличие от штамма А/WSN/33, неспособность к активному размножению при 38°C и 39°C. Все полученные сайт-специфические мутанты с единичными аминокислотными заменами в PB2-белке заметно снизили способность к размножению в куриных эмбрионах при 39°C. Включение дополнительных ts-мутаций в PB2-ген штамма А/WSN/33 приводило к получению двойных мутантов, которые характеризовались дальнейшим изменением ts-фенотипа. Все двойные мутанты утратили способность к размножению в куриных эмбрионах при 39°C, и было отмечено снижение способности двойных мутантов к размножению в куриных эмбрионах при 38° С (shutoff температура снизилась до 38°C). Наиболее выраженное изменение ts-фенотипа наблюдалось у трансфектанта U2 с тремя ts-мутациями в геноме. Shutoff температура данного вируса приблизилась к 37°C.

Таблица 2. Сравнительное изучение ts-фенотипа и att-фенотипа сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33(H1N1), имеющих мутации в PB2-гене и ХА реассортанта, полученного при скрещивании ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штамма А/ WSN/33 (H1N1)

Исследуемые вирусные варианты	Титр вирусосодержащей жидкости в куриных эмбрионах (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл)			Титр вируса в легких мышей (lg ЭИД <sub>50</sub> / 0,2 мл)
	34° С	38° С	39° С	
А/WSN/33(H1N1)	6,5±0,5	6,5±0,4	6,25±0,4	5,0±0,4
А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	8,0±0,4	4,0±0,5	1,5±0,4	1,5±0,5
ХА реассортант А/Краснодар /101/35/59 х А/WSN/33	8,0±0,5	4,0±1,0	1,5±0,4	1,5±0,5
Тр. № 10 PB2 А/Краснодар/101/35/59 (Val 290 Leu)	6,5±0,5	5,0±1,0	4,0±0,5	3,0±0,4
Тр. № 11 PB2 А/ Ленинград/134/17/57 (Val 478 Leu)	5,5±0,4	4,0±1,0	2,5±0,5	3,0±0,5
Тр. № 12 PB2 А/ Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser )	7,0±0,6	4,5±1,0	3,5±1,0	2,5±0,5
Тр. № 13 (LAK2) PB2 А/Краснодар/101/35/59 (Val 290 Leu) + А/Ленинград /134/17/57 ( Val 478 Leu )	7,0±1,0	3,5±0,5	<1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр.№ 14 (AAK2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser) + А/Краснодар /101/35/59 ( Val 290 Leu)	6,5±0,5	3,5±0,4	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр. № 15 (AAL2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser )+ А/Ленинград /134/17/57 ( Val 478 Leu )	6,75±0,4	3,5±1,0	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр. № 16 (U2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser) + А/Краснодар / 101/35/59 (Val 290 Leu ) + А/Ленинград/ 134/17/57 ( Val 478 Leu )	6,25±0,6	2,25±0,5	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>

Исходный вирулентный штамм А/WSN/33 активно размножался в легких мышей при интраназальном размножении. Через 72 часа после начала инфекции титр вируса в легких равнялся lg 5,0±0,4, ЭИД<sub>50</sub>/0,2мл. ХА штамм-донор А/Краснодар/101/35/59 практически утерьял способность к размножению в легких мышей. ХА реассортант, полученный при скрещивании штамма А/WSN/33 и ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, не отличался от ХА штамма-донора по att-фенотипу. Трансфектанты с включением единичных мутаций в PB2-гене характеризовались заметным снижением размножения вируса в легких (табл. 2), в отличие от исходного вирулентного штамма. Трансфектанты с двойными мутациями в PB2-гене (AAL2, AAK2, LAK2), а также трансфектант U2 утерьяли способность к размножению в легких мышей.

Группы мышей были интраназально иммунизированы двукратно дозой 10<sup>4,0</sup> ЭИД<sub>50</sub> трансфектантами U2, LAK2, AAL2, AAK2, трансфектантом №20 (V478L) и ХА реассортантом А/Краснодар/101/35/59 х А/WSN/33. Мышам контрольной группы двукратно интраназально вводили физраствор. Через 10 дней после второй имму-

низации у мышей брали кровь и определяли титр антител, ингибирующих гемагглютинацию. Анализируемые вирусы индуцировали у иммунизированных мышей различный уровень гуморальных антител. Наиболее высокие титры антител наблюдались в крови мышей, иммунизированных трансфектантами LAK2, AAK2, U2 и ХА реассортантом ( $\log_2$  7,61±0,87; 7,65±0,54; 7,55±0,54; 8,05±0,61). Трансфектант №11 (V478L) и AAL2 индуцировали более умеренный титр гуморальных антител ( $\log_2$  7,05±0,5; 6,85±0,44). На следующем этапе через 10 дней после второй иммунизации мыши были инфицированы интраназально 10 МЛД<sub>50</sub> (10<sup>3.0</sup> ЭИД<sub>50</sub>) штамма А/WSN/33. Через 72 часа у мышей были извлечены легкие и было исследовано размножение вируса в легких у мышей, иммунизированных анализируемыми вирусами. У неиммунизированных мышей из контрольной группы титр размножения вирулентного вируса достигал 4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. У мышей, иммунизированных ХА реассортантом, наблюдалось полное подавление размножения вируса в легких. Аналогичный результат наблюдался во всех группах мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33.

Представляло интерес провести сравнительное исследование защитной эффективности полученных нами сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33 и классического ХА реассортанта против вируса гриппа другого серотипа. С этой целью группы мышей, иммунизированных вышеупомянутыми вирусами, и мыши контрольной группы через 10 дней после второй иммунизации были интраназально инфицированы штаммом А/Утка/ Пенсильвания/ 10218/ 1984/ вируса гриппа птиц (H5N2), адаптированного к мышам [14]. Инфицирующая доза составляла 10 МЛД<sub>50</sub> (10<sup>3.0</sup> ЭИД<sub>50</sub>). У части мышей из каждой группы была исследована сыворотка крови на наличие антител к вирусу птичьего гриппа серотипа H5N2. Как видно из табл. 3, у иммунизированных мышей и мышей из контрольной группы не были обнаружены антитела к вирусу гриппа птиц H5N2. Интраназальное инфицирование мышей контрольной группы вирусом птичьего гриппа вызывала 100% летальность на 8-9 сутки после инфицирования; 50% летальность наблюдалась в группе мышей, иммунизированных трансфектантом № 11, имеющим в PB2-белке мутацию Val 478 Leu; 25% летальность была отмечена в группе мышей, иммунизированных трансфектантом AAL2, имеющим 2 мутации в PB2-белке (265+478). Остальные 4 группы мышей, иммунизированных мутантами U2, LAK2, AAK2 и ХА-реассортантом, характеризовались 100% выживаемостью. Мы исследовали интенсивность размножения вируса птичьего гриппа H5N2 в легких мышей каждой группы. Как видно из табл. 3, наибольшая интенсивность размножения наблюдалась в легких мышей контрольной группы: 10<sup>4.5</sup> ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Однако в легких мышей из других групп мы наблюдали довольно значительное размножение вируса (табл. 3). С учетом полного отсутствия антител к вирусу гриппа птиц в крови иммунизированных животных высокую выживаемость мышей можно было объяснить только индуцированной активностью клеточного иммунитета.

Анализ распределения мутаций в геноме ХА штаммов-доноров аттенуации вируса гриппа свидетельствовал о том, что наиболее важные мутационные замены сосредоточены в белках полимеразного комплекса: PB1, PB2, PA. Однако эффективность прямого включения аттенуирующих мутаций в гены, кодирующие белки полимеразного комплекса, различна. Это обусловлено структурно-функциональными свойствами этих белков. Белок PB2 обладает высокой пластичностью, и это позволяет включить в этот белок различное количество мутаций. Последнее обстоятельство дает возможность сохранять баланс между требуемым уровнем аттенуации и высокой иммуногенностью.

Включение в PB2-ген штамма А/WSN/33 единичных мутаций из генома ХА-штаммов доноров аттенуации приводило незначительным изменениям ts-фенотипа и att-фенотипа. Однако при увеличении количества включенных в PB2-ген ts-мутаций, полученные мутанты полностью утратили способность к репликации при повышенной температуре и размножению в легких мышей при интраназальном заражении. Интраназальная иммунизация мышей полученными сайт-специфически-

**Таблица 3. Сравнительное изучение защитной эффективности ХА реассортанта и вариантов штамма А/WSN/33 вируса гриппа, содержащих сайт-специфические мутации в PB2 гене при контрольном гетерологичном заражении**

Варианты штамма А/WSN/33 вируса гриппа, использованные для иммунизации	Титр антител к штамму А/Утка/Пенсильвания/10218/1984 вируса гриппа птиц (H5N2) в РЗГА	Титр штамма А/Утка/Пенсильвания/10218/1984 (H5N2) вируса гриппа птиц в легких мышей (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл)	% гибели мышей после контрольного гетерологичного заражения
ХА реассортант А/WSN/33 х А/Краснодар/101/35/59	< 1: 20	2,74±0,70	0
Тр.№13 LAK2 (290+378)	< 1:20	1,73±0,56	0
Тр.№15 AAL 2 (265+478)	< 1:20	3,24±0,78	25
Тр.№14 AAK 2 (265+290)	< 1:20	3,21± 0,64	0
Тр.№16 U 2 (265+290+478)	< 1:20	2,24±0,48	0
Тр. № 11 PB2 А/Ленинград/134/17/57 (Val 478 Leu)	< 1: 20	2,32± 0,25	50
Неиммунные мыши	< 1: 20	4,54± 1,1	100

ми мутантами индуцировала заметный титр гуморальных антител, ингибирующих гемагглютинацию. Большинство сайт-специфических мутантов с двумя и тремя мутациями в PB2-гене не уступало по защитной эффективности ХА-реассортанту, имеющему поверхностные антигены, аналогичные поверхностным антигенам штамма А/WSN/33 как при гомологичном, так и гетерологичном контрольном заражении. Важнейшим условием дальнейшего изучения и практического использования полученных мутантов является анализ их генетической стабильности. Данные, полученные Parkin N. et al. и Subbarao E.K. et al. [12, 18] указывают на важность определенного количества мутаций в PB2-гене, гарантирующего отсутствие реверсий к дикому типу. Дальнейшие усилия нашей лаборатории будут сосредоточены на этом направлении.

#### 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. *Вопр. вирусол.* 2013, 58:11-17.
3. Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P. et al. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology.* 1988, 167:554-567.
4. Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy. *J. Virol.* 2015, 90 (5):2702-2705.
5. Herlocher M.L., Maassab H.F., Webster R.G. Molecular and biological changes in the cold-adapted «master strain» A/ AA/6/60 (H2N2) influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90:6032-6036.
6. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y. et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97(11):6108-6113.
7. 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.
8. Klimov A.I., Cox N.J., Yotov W. et al. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variant of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus. *Virology.* 1992, 186(2):795-797.
9. Lawson C.M., Subbarao E.K., Murphy B.R. Nucleotide sequences changes in the polymerase basic protein 2 gene of temperature-sensitive mutants of influenza A virus. *Virology.* 1992, 191:506-510.



10. Maassab H. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967, 213:612-614.
11. McCauley J.W., Penn C.R. The critical cut-off temperature of avian influenza viruses. *Virus Res*. 1990, 17:191-198.
12. Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol*. 1997, 71(4):2772-2778.
13. Polshaev F.I. The conditions of influenza virus ts-recombinants development. *Acta virologica*. 1978, 22:263-269.
14. Smirnov Y.A. et al. Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to mammalian host. *Acta virologica*. 2000, 44(1):1-8.
15. Snyder M. H., Betts R.F., De Borde D. et al. Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines. *J. Virol*. 1988, 62:488-495.
16. 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.
17. 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.
18. Subbarao E.K., Park E., Lawson C. et al. Sequential addition of 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):59-69.
19. Yamanaka K., Ogasawara N., Ueda M. et al. Characterization of a temperature —sensitive mutant in the RNA polymerase PB2 subunit gene of influenza A/WSN/33 virus. *Arch. Virol*. 1990, 114:65-73.
20. Zhou B., Li Yo., Speer S. et al. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012, 30(24):3691-3702.

*Поступила 20.07.18*

Контактная информация: Маркушин Станислав Георгиевич,  
109044, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Д.В.Ефременко, Н.Ф.Василенко, В.И.Ефременко*

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ: ОЦЕНКА ВНЕШНЕЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ УГРОЗЫ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

В статье обосновывается разделение инфекций на представляющие индивидуальную и популяционную опасность с учетом территориального и сезонного риска распространения при их заносе и дифференциация последних по угрозе возникновения чрезвычайной ситуации биологического характера при эпидемических проявлениях, что позволит оптимизировать алгоритмы реагирования и организации противоэпидемических мероприятий. Предложен новый относительный критерий «ориентирное число заражений от одного источника», отражающий потенциальную способность возбудителя передаваться внутри человеческой популяции. Проведена оценка риска распространения и угрозы возникновения чрезвычайной ситуации при заносе на территорию Российской Федерации некоторых представляющих популяционную опасность болезней: чумы (в легочной и бубонной форме), холеры, геморрагических лихорадок с ведущим контактным механизмом передачи возбудителя, особо опасных ортопоксвирусных и коронавирусных инфекций, Крымской геморрагической лихорадки, полиомиелита.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 76—82

Ключевые слова: эпидемиологическая угроза, занос инфекции, риск распространения инфекции, особо опасные инфекции, чрезвычайная ситуация, биологическая безопасность, массовые мероприятия