

## ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДГОТОВКИ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

*Цель.* Оценка эффективности метода подготовки реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины и пути его оптимизации, учитывающие различия актуальных эпидемических вирусов гриппа по ключевым для процесса селекции биологическим характеристикам. *Материалы и методы.* Вирусы гриппа — кандидаты в сезонные ЖГВ, доноры аттенуации для отечественной реассортантной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. Получение штаммов ЖГВ в развивающихся куриных эмбрионах включало реассортацию, селективные пассажи при пониженной температуре и в присутствии гипериммунной сыворотки к донору аттенуации, несколько этапов клонирования реассортантов, их вирусологическую и молекулярно-генетическую характеристику. Эпидемические вирусы гриппа и штаммы живых гриппозных вакцин оценивали по способности к репродукции при температуре за пределами оптимальных значений, по чувствительности к ингибиторам сыворотки крови. *Результаты.* Проведена оценка природных свойств используемых в скрещивании эпидемических вирусов. Представлены данные об эффективности получения реассортантных штаммов ЖГВ в зависимости от биологических свойств эпидемических вирусов гриппа: их температуроустойчивого, холодочувствительного фенотипа, ингибитороустойчивости и рецепторной специфичности. *Заключение.* На основе оценки влияния биологических особенностей эпидемических вирусов на успех реассортации подобраны наиболее рациональные методические приемы для максимально эффективного получения штаммов живых гриппозных аттенуированных вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 24—34

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина (ЖГВ), доноры аттенуации для ЖГВ, температурочувствительный фенотип, холодоустойчивый фенотип, аттенуация, чувствительность/устойчивость к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади

N.V.Larionova, I.V.Kiseleva, E.A.Bazhenova, E.P.Grigorieva, L.G.Rudenko

## THE INFLUENCE OF SEASONAL INFLUENZA VIRUSES BIOLOGICAL FEATURES ON THE EFFECTIVENESS OF DEVELOPMENT STRAINS FOR LIVE INFLUENZA VACCINE

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

*Aim.* Evaluation of the efficiency of the method of reassortant strains for live influenza vaccine development and ways to optimize it, taking into account the differences in the current epidemic influenza viruses by key biological characteristics. *Materials and methods.* Influenza viruses — candidates for seasonal LAIVs, MDVs for Russian LAIVs A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and B/USSR/60/69. The vaccine strains development in developing chicken embryos included reassortment, selective passages at low temperature in the presence of hyperimmune serum to the MDV, several stages of reassortants cloning, their virological and molecular genetic characteristics. Epidemic influenza viruses and LAIVs strains were evaluated by their ability to reproduction at temperatures beyond optimal values, by sensitivity to serum inhibitors. *Results.* The assessment of phenotypic properties used in reassortment epidemic viruses is carried out. Presented the data on the efficiency of development reassortant strains for LAIV depending on the biological properties of circulating epidemic influenza viruses: their temperature-resistant, cold-sensitive phenotype, inhibitor resistance, and receptor specificity. *Conclusion.* Based on the assessment of the influence of the biologi-

cal characteristics of the epidemic viruses, the rational methodological techniques for the most effective development of reassortants for LAIV are selected.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 24–34

Key words: live attenuated influenza vaccine (LAIV), master donor viruses (MDV) for LAIV, temperature-sensitive phenotype, cold-adapted phenotype, attenuation, sensitivity/resistance to non-specific horse blood serum inhibitors

## ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация является эффективным средством профилактики заболеваемости гриппом. Однако успех вакцинации осложнен непрерывной изменчивостью антигенных свойств вирусов гриппа, что приводит к необходимости регулярного обновления состава вакцинного В препарата.

Живые гриппозные аттенуированные вакцины (ЖГВ) стабильно демонстрируют безвредность, иммуногенность, высокие защитные свойства для всех возрастных групп населения и способность к формированию коллективного иммунитета [6, 7]. Эти несомненные достоинства, наряду с перекрестной защитой против дрейфовых вариантов вируса гриппа, долговременностью иммунного ответа, неинвазивным способом введения [1, 6, 7], позволили Всемирной организации здравоохранения рекомендовать ЖГВ в качестве эффективного препарата для контроля заболеваемости гриппом.

Мировой приоритет в разработке реассортантных ЖГВ принадлежит коллективу отдела вирусологии Института экспериментальной медицины, где проводится регулярная подготовка реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ на основе отечественных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69.

Штаммы ЖГВ являются продуктом реассортации актуальных эпидемических вирусов гриппа с генетически стабильными температурочувствительными (ts), холодоустойчивыми (ca) и аттенуированными (att) для человека донорами аттенуации [1].

Антигенная актуальность вакцинного реассортанта обеспечивается наследованием от эпидемического вируса двух генов, кодирующих белки оболочки — HA и NA, а безвредность гарантируется наследованием от донора аттенуации 6 генов, кодирующих внутренние белки (вакцинная формула генома 6:2). Аттенуация обусловлена ограничением распространения температурочувствительного вакцинного вируса за входные ворота инфекции из-за более высокой температуры в нижних отделах респираторного тракта [1, 7].

В метод получения вакцинных реассортантов заложены различия биологических свойств созданных в лаборатории ts/ca/att доноров аттенуации и естественно циркулирующих эпидемических вирусов гриппа. Ко времени разработки метода, в 1970-х годах, циркулирующие вирусы гриппа характеризовались способностью к репродукции при превышающей физиологический оптимум температуре и отсутствием репродукции при пониженной температуре инкубации (non-ts/non-ca фенотип). Эти характеристики считались неотъемлемым признаком патогенных штаммов [14].

На основе принятых за аксиому различий в характеристиках доноров и эпидемических вирусов были подобраны селективные факторы, которые обеспечивают направленный отбор реассортантов с заданными характеристиками. Такими се-

лективными факторами являются пониженная до 25-26°C температура инкубации и культивирование в присутствии гипериммунной сыворотки против донора аттенуации. Температура 25-26°C создает условия приоритетного отбора реассортантов с генами, кодирующими внутренние белки холодоустойчивого донора, а гипериммунная сыворотка против донора способствует отбору реассортантов, наследующих антигены HA и NA от эпидемического родителя [1]. За этапом скрещивания в развивающихся куриных эмбрионах следуют селективные пассажи и несколько этапов клонирования реассортантов.

Успех получения вакцинных препаратов напрямую зависит от свойств вступающих в реассортацию вирусов. Донор аттенуации характеризуется стабильностью генетических признаков [2], тогда как, вопреки существовавшим ранее представлениям, биологические свойства эпидемических вирусов могут существенно различаться. Нередко выделяются штаммы с нехарактерными для высоковирулентных вирусов признаками — ts или/и sa фенотипом [3, 5, 9, 13]. Это касается не только ряда случайных изолятов, но и эталонных вирусов, рекомендуемых ВОЗ для разработки актуальных вакцинных штаммов.

Помимо non-ts/non-sa фенотипа, для успеха получения реассортантных штаммов ЖГВ благоприятным фактором является соответствие рецепторной специфичности эпидемического вируса рецепторам клеток хозяина, в котором проводится скрещивание.

Для получения вакцинных штаммов вируса гриппа законодательно разрешено использовать актуальные эпидемические вирусы, выделяемые и культивируемые исключительно в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Маркером рецепторной специфичности вирусов может служить показатель чувствительности (is) либо устойчивости (ir) вирусного гемагглютиниона к неспецифическим ингибиторам, присутствующим в неиммунной сыворотке крови лошади. Гемагглютинином вирусов гриппа человека в качестве рецепторов на чувствительной клетке распознаются гликаны с сиалил  $\alpha$ -2,6 галактозной специфичностью. Вирусы гриппа птиц для рецепторного взаимодействия используют гликаны с сиалил  $\alpha$ -2,3 галактозной специфичностью [12]. Сыворотка крови лошади содержит большое количество  $\alpha_2$ -макроглобулинов с углеводными компонентами, включающими сиалил  $\alpha$ -2,6 галактозные остатки, которые имитируют клеточные рецепторы для вирусов гриппа человека и за счет этого способны ингибировать вирус. Поэтому фактор чувствительности либо устойчивости к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади служит маркером  $\alpha$ -2,6 либо  $\alpha$ -2,3 рецепторной специфичности вирусов.

При подготовке реассортантов ЖГВ ингибитороустойчивость дает эпидемическому компоненту скрещивания равные с ir донором аттенуации репродуктивные возможности в клетках РКЭ. Ингибиторочувствительность эпидемического родителя ставит его в менее благоприятные условия для репродукции в сравнении с донором аттенуации. Кроме того, чувствительность к сывороточным ингибиторам может приводить к неспецифическому связыванию гемагглютининов эпидемического вируса с применяемой в методике сывороткой против донора аттенуации, что затрудняет селекцию вариантов с вакцинной формулой генома.

Отклонения фенотипических свойств эпидемического родителя от принятых за стандарт в методике получения штаммов для ЖГВ становятся дестабилизирующим фактором при проведении селективных пассажей. Чтобы преодолеть возникающие сложности, необходимо вносить определенные коррективы в процесс подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомендованные ВОЗ актуальные эпидемические вирусы гриппа получены из CDC (США), NIBSC (Великобритания), ВОЗ (Швейцария). Доноры аттенуации для отечественной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 получены из музея отдела вирусологии ИЭМ.

Для накопления вирусы инкубировали в 10-11-дневных РКЭ при 32-33°C. В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали также при пониженной температуре 25°C (6 суток) и повышенной температуре 37, 38, 39 и 40°C (2 суток — вирусы гриппа А, 3 суток — вирусы гриппа В).

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров (признак RCT) при оптимальной (32-33°C) и повышенной до 37, 38, 39 или 40°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными при RCT не менее 4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, температуроустойчивыми — при RCT не более 3,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Вирусы оценивали как  $\pm ts$  при RCT в пределах 3,5—4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл.

Холодоустойчивость вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и пониженной до 25°C температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми при RCT<sub>25</sub> не менее 4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, холодоустойчивыми — при RCT<sub>25</sub> не более 3,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Вирусы оценивали как  $\pm sa$  при RCT<sub>25</sub> в пределах 3,5—4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл.

Получение реассортантных штаммов ЖГВ проводили в РКЭ на основе ежегодных рекомендаций ВОЗ по стандартной методике [1].

Реакцию торможения гемагглютинации, в соответствии с [18], проводили для определения антигенной принадлежности НА штаммов вируса гриппа со специфическими иммунными крысиными сыворотками, используя 1% взвесь эритроцитов кур или человека.

Чувствительность вирусов гриппа к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови оценивали в РТГА, используя в качестве источника ингибиторов прогретую 10 мин при 80°C неиммунную сыворотку крови лошади (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Вирусы считали устойчивым к термостабильным ингибиторам сыворотки крови, если обратная величина титра сыворотки, нейтрализующей вирус в РТГА, не превышала 40 единиц. При титре выше 40 единиц вирусы оценивали как ингибиторочувствительные.

Определение состава генома реассортантных штаммов вируса гриппа А и В проводили методом мультиплекс-ПЦР [4] и секвенированием ДНК-копий генов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Характеристика сезонных эпидемических вирусов гриппа, применявшихся для получения реассортантных ЖГВ.*

Исследованные характеристики ряда эпидемических вирусов, на основе которых в разные годы были подготовлены штаммы ЖГВ, демонстрируют неоднородность их биологических свойств (табл.). Лишь незначительное количество эталонных вирусов, которые выбирались кандидатами в вакцины с 1994 года по настоящее время, обладают типичными характеристиками высоковирулентных штаммов: способностью к репродукции при 39-40°C (38°C для вирусов гриппа В) и слабой репродуктивной активностью при пониженной температуре (non-ts/non-sa фенотип). Среди эталонных вирусов гриппа А, представленных в табл., такие характеристики демонстрируют возбудитель пандемии 2009 года А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm,

**Биологические характеристики эпидемических вирусов гриппа А и В, кандидатов в вакцинные штаммы разных лет, в сравнении со свойствами доноров аттенуации для живой гриппозной вакцины**

Вирусы	Питр вируса при 33°С	RСТ <sub>50%</sub> *			RСТ <sub>35</sub>	Фенотип при t(°С)			Чувствительность к термостабильным ингибиторам
		RСТ <sub>50%</sub> *	RСТ <sub>50%</sub> *	RСТ <sub>50%</sub> *		39°(37)	40°(38)	25°	
<b>Эпидемические вирусы А (H1N1)</b>									
А/Соломоновы острова/03/06	9,2±0,3	2,5	>8,0	5,0		ts	pop-ca	ir	<10
А/Гонконг/2652/06	9,3±0,1	2,8	>8,1	5,8		pop-ts	pop-ca	ir	<10
А/Брисбен/59/07	9,7±0,2	8,0	>8,5	6,0		ts	pop-ca	ir	<10
А/Калифорния/07/09 (H1N1)rdm	8,7±0,2	0,0	0,8	6,0		pop-ts	pop-ca	ir	<10
А/Боливия/559/2013(H1N1)rdm	9,7±0,1	0,2	0,7	7,5		pop-ts	pop-ca	ir	<10
<b>Эпидемические вирусы А (H3N2)</b>									
А/Иоганнесбург/33/94	7,7±0,4	>6,5	>6,5	5,5		ts	pop-ca	ir	<10
А/Нанчанг/933/95	7,7±0,4	3,0	>6,5	>6,5		pop-ts	pop-ca	is	320
А/Вайоминг/3/03	8,5±0,3	н.и.	>7,3	5,3		н.и.	pop-ca	ir	20
А/Брисбен/10/07	7,2±0,2	н.и.	>6,0	>6,0		н.и.	pop-ca	is	320
А/Виктория/361/11	8,2±0,2	-0,9	2,0	6,2		pop-ts	pop-ca	ir	<10
А/Техас/50/12	8,2±0,2	1,0	6,0	6,0		pop-ts	pop-ca	ir	40
<b>Эпидемические вирусы гриппа В</b>									
В/Петербург/92/95	7,7±0,2	5,0	>6,5	>6,5		ts	pop-ca	is	2560
В/Иоганнесбург/05/99	8,0±0,3	н.и.	6,0	5,0		н.и.	pop-ca	is	320
В/Шанхай/361/02 <sup>1,2</sup>	7,0±0,2	>5,8	>5,8	5,3		ts	pop-ca	is	320
В/Джиллин/20/03	8,7±0,5	5,5	>7,5	6,0		ts	pop-ca	is	2560
В/Малайзия /06/04	9,2±0,3	1,8	>8,0	2,7		pop-ts	ca	ir	20
В/Флорида/07/04	10,2±0,1	8,5	8,5	5,0		ts	pop-ca	is	320
В/Брисбен/60/08	8,7±0,4	>7,5	>7,5	6,5		ts	pop-ca	ir	10
В/Висконсин/1/10	6,9±0,4	>5,2	>5,2	5,2		ts	pop-ca	is	640
В/Техас/06/11	7,0±0,5	5,0	>5,8	2,5		ts	ca	is	2560
В/Массачусетс/2/12	8,2±0,3	0,9	6,0	4,9		pop-ts	pop-ca	is	320
<b>Донор аттенуации</b>									
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	9,2±0,2	7,5	8,0	2,5		ts	ca	ir	<10
В/СССР/60/69	9,7±0,3	1,5	8,0	2,0		pop-ts	ca	ir	<10

П р и м е ч а н и я. \*В скобках указана температура репродукции вирусов гриппа В; н.и. — не исследовали.

его дрейфовый вариант А/Боливия/559/2013(H1N1)pdm, А/Виктория/361/2011 (H3N2), А/Соломоновы острова/03/06 (H1N1) и антигенно близкородственный ему А/Гонконг/2652/06 (H1N1).

Все современные эталонные вирусы гриппа В при 38°C проявляют ts фенотип, более того, для большинства ограничительной температурой репродукции является уже 37°C. Следует отметить при этом, что для донора аттенуации В/СССР/60/69, полученного из эпидемического вируса, который был выделен в период циркуляции высокотемператууроустойчивых штаммов, ts фенотип при 38°C уже является показателем аттенуации, а к температуре 37°C донор аттенуации более устойчив, чем современные эпидемические вирусы ( $RCT_{37}=1,5 \lg ЭИД_{50}/мл$ ).

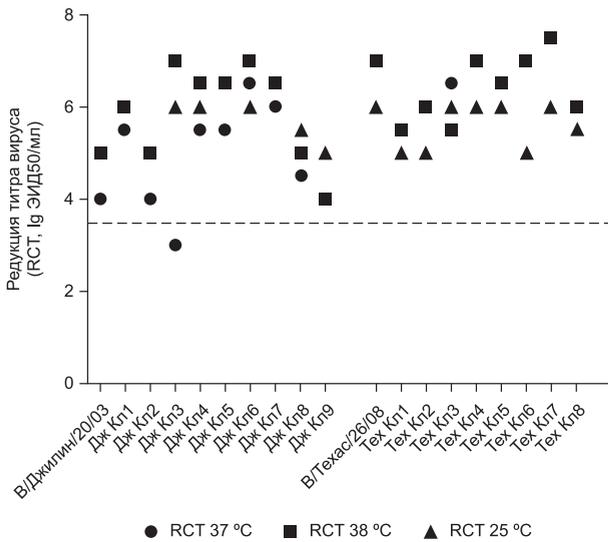
Некоторые вирусы, помимо температурочувствительности, характеризуются способностью к достаточно активной репродукции при 25°C, как, например, штамм В/Техас/06/11, который считался потенциальным кандидатом в эталонные вирусы в 2012 году. Возможно, из-за таких биологических особенностей В/Техас/06/11 так и не приобрел эпидемического значения. Примером холодоустойчивости ( $RCT_{25}=2,7 \lg ЭИД_{50}/мл$ ) является также эталонный вирус В/Малайзия/06/04, который при этом характеризуется non-ts<sub>37</sub>/ts<sub>38</sub> фенотипом.

Еще один показатель, имеющий значение при подборе оптимальных условий селекции вакцинных реассортантов — взаимоотношение эпидемических вирусов гриппа с неспецифическими термостабильными ингибиторами неиммунной сыворотки крови лошади. Исследованные вирусы гриппа сероподтипа А(H1N1) и вирусы гриппа В линии Виктория были устойчивы к ингибиторам сыворотки крови лошади, тогда как вирусы гриппа В линии Ямагата и ряд вирусов гриппа А(H3N2) характеризовались ингибиторочувствительностью.

Учитывая разнообразие эпидемических вирусов по ключевым для реассортации биологическим характеристикам, для стабильно быстрого и успешного получения вакцинных штаммов следует индивидуально подбирать методические приемы.

*Особенности подготовки 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, обычно холодоустойчивость эпидемических вирусов ниже, в сравнении с донорами аттенуации (табл.), и пониженная до 25°C температура как селективный фактор сохраняет свою эффективность. Если же эпидемический вирус высоко холодоустойчив, пассажи реассортантов при пониженной температуре теряют селективное значение. В этом случае остается полагаться на единственный селективный фактор — сыворотку против донора аттенуации и проводить селективные пассажи при оптимальной температуре. Молекулярно-генетический отбор вакцинного 6:2 реассортанта потребует более значительных временных затрат из-за разнообразия формирующихся реассортантов в отсутствие одного из селективных ограничителей.

*Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе температурочувствительных эпидемических вирусов гриппа.* При реассортации с донором аттенуации температурочувствительных эпидемических вирусов условия функционирования их полимеразного комплекса приближаются к условиям активности полимеразного комплекса донора, что не дает преимуществ в селекции генов, кодирующих внутренние белки донора аттенуации. Для оптимизации процесса реассортации в ряде случаев существует возможность подбирать в качестве эпидемических родительских вирусов штаммы, антигенно идентичные рекомендованным ВОЗ, но обладающие большей устойчивостью репродукции при превышающей оп-



**Рис.1.** Характеристика репродуктивной активности клонов из популяции эпидемических вирусов гриппа В в развивающихся куриных эмбрионах.

характеризовались *ts* фенотипом, как исходный вирус ( $RCT_{37} = 5,2 \pm 0,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ ), тогда как клон 3 оказался значительно более термостойчивым ( $RCT_{37} = 3,2 \pm 0,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ ). Однако отличающийся по термостойкости клон удается изолировать не всегда. Так, все 8 исследованных клонов термостойчивого вируса В/Техас/26/08 также характеризовались *ts* фенотипом уже при 37°C  $RCT_{37} = 5,6 \pm 0,4 \lg \text{ЭИД}_{50}$ . В случае успешного отбора *non-ts* клона, как произошло при клонировании вируса В/Джилин/20/03, в скрещивание целесообразно взять именно его.

*Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе эпидемических вирусов гриппа, чувствительных к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови.* Антисыворотка к донору аттенуации, используемая в селективных пассажах, обрабатывается прогреванием и разрушающим неспецифическим ферментом RDE (Receptor destroying enzyme, Denka Seiken, UK). Однако остаточный уровень термостабильных ингибиторов может сохраняться. Это искажает значения титра сыворотки и может осложнять получение вакцинных реассортантов на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов.

Поскольку эпидемический вирус, как и донор *att*, адаптированы к размножению в куриных эмбрионах, они приобретают специфичные для куриных эмбрионов мутации еще до скрещивания, это может происходить уже при единственном накоплении [16]. На клетках хориоаллантоисной оболочки (ХАО) куриного эмбриона преобладают  $\alpha$ -2,3 рецепторы, поэтому культивирование вирусов человека в РКЭ приводит к перенастраиванию рецепторспецифичного сайта HA с  $\alpha$ -2,6 на  $\alpha$ -2,3 рецепторное взаимодействие. Выявляться это может снижением ингибирования вируса макроглобулинами сыворотки крови лошади [10]. Если путь приспособления вирусов человека к новому хозяину происходит за счет появления мутаций, обеспечивающих способность использовать рецепторы обоих типов —  $\alpha$ -2,6 и  $\alpha$ -2,3, либо за счет полной перенастройки на  $\alpha$ -2,3 тип связи, то вирус не будет ингибироваться лектинами сыворотки крови лошади. Если же вирусы сохраняют чувствительность к ингибиторам, следовательно, они сохраняют  $\alpha$ -2,6 тип взаимодействия. Вероятно, от

тимальные значения температуры. Примером таких антигенных аналогов могут быть *ts*<sub>40</sub> вирус А/Техас/50/12 и *non-ts*<sub>40</sub> вирус А/Виктория/361/11 (H3N2) (табл.).

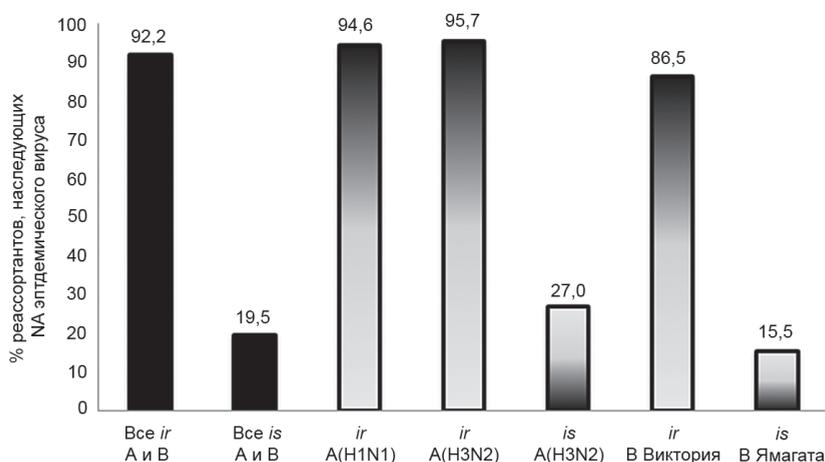
В некоторых случаях существует возможность отбора термостойчивого клона из популяции исходно термостойчивого вируса. На рис.1 представлены результаты попытки выделить термостойчивые клоны из популяции двух термостойчивых вирусов гриппа В/Техас/26/08 (линия Виктория) и В/Джилин/20/03 (линия Ямагата). Среди 9 изолированных клонов термостойчивого при 37°C вируса В/Джилин/20/03 восемь клонов

таких вирусов нельзя ожидать высокой репродуктивности в РКЭ. Следует отметить, 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, адаптация к клеткам ХАО, имеющим  $\alpha$ -2,3-рецепторную специфичность, происходит у эпидемического вируса при культивировании в РКЭ сразу после выделения от человека. Возможно, подобная адаптация сопровождается дополнительными мутациями, не затрагивающими  $\alpha$ -2,6-рецепторный сайт, что не меняет взаимодействие вируса с лошадиной сывороткой.

Оценка роли чувствительности/устойчивости вирусов к ингибиторам сыворотки крови может быть рассмотрена в двух аспектах: (1) влияние на успех подготовки штаммов ЖГВ и (2) влияние на качество вакцинного препарата, что имеет определяющее значение.

(1) При разработке штаммов ЖГВ на основе современных вирусов гриппа А и В часто приходится сталкиваться с ситуацией, когда в геном реассортанта включается нейраминидаза донора аттенуации. Как нами было показано ранее, NA от донора аттенуации в подавляющем большинстве наследовали характеризующиеся ингибиторочувствительностью вирусы гриппа А(Н3N2) и В линии Ямагата [11]. Только 19,5% от общего числа клонов на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов наследовали NA «дикого» типа, тогда как среди реассортантов на основе природно-устойчивых к термостабильным сывороточным ингибиторам вирусов А(Н1N1), А(Н3N2) и В линии Виктория их количество возрастало до 92,2%. Описанные результаты обобщены на рис.2.

Оценка эпидемических вирусов по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам позволяет подобрать наиболее рациональные мероприятия для успешного получения вакцинных реассортантов на основе актуального *is* вируса. Поскольку куриные эмбрионы на хориоаллантоисной оболочке преимущественно содержат  $\alpha$ -2,3 рецепторы, то при реассортации эпидемического ингибиторочувствительного родителя, имеющего сродство к  $\alpha$ -2,6 рецепторам, с донором аттену-



**Рис.2.** Наследование реассортантами нейраминидазы от эпидемического родителя при скрещивании с донорами аттенуации 118 ингибиторочувствительных (*is*) и 283 ингибиторочувствительных (*ir*) вирусов гриппа А и В (в % от общего количества реассортантов).

ации преимущество будет иметь хорошо адаптированный к репродукции в РКЭ *ir* донор аттенуации. Поэтому для обеспечения равных возможностей обоих родительских вирусов на этапе скрещивания следует давать множественное преимущество эпидемическому вирусу.

Требуется также обеспечить подбор оптимальной рабочей концентрации антител к донору, которая не должна превышать установленную экспериментально концентрацию 50 ГАЕ. В этой ситуации особенно важно использование максимально высокотитражной сыворотки, что позволяет снизить концентрацию неспецифических ингибиторов в рабочем разведении сыворотки и минимизировать неспецифическое ингибирование НА *is* родителя.

Существует опасение, что ингибиторочувствительные штаммы как обладающие сродством к  $\alpha$ -2,6 рецепторам могут приобретать адаптивные мутации в НА в процессе накопления вируса в РКЭ. Кроме того, рецепторсвязывающий карман в структуре гемагглютинаина 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 культивировании в РКЭ вирус А/Виктория/361/11 приобрел мутацию, влияющую на его антигенную характеристику [18].

(2) Поскольку вирусы с  $\alpha$ -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  $\alpha$ -2,3 рецепторной специфичностью, что, в конечном счете, должно положительно сказаться 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  $\alpha$ -2,3-терминированные гликаны [8], что также свидетельствует в пользу вакцинных препаратов на основе ингибиторочувствительных вирусов с  $\alpha$ -2,6 типом рецепторного взаимодействия. Однако в какой степени неспецифические ингибиторы человека влияют на вакцинный штамм в организме судить 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 иметь преимущества при подготовке вакцины для людей [15], что коррелирует с нашими выводами.

Из ранних клинических исследований с выделением вирусов от заболевших было сделано заключение, что устойчивые к ингибиторам сыворотки лошади вирусы вызывают меньше реакций, чем чувствительные к ингибиторам [17]. Скорее всего, меньше реакций потому, что *ir* вирусы могут хуже репродуцироваться в клетках человека.

Таким образом, существует противоречие: для эффективного получения вакцинных реассортантов в РКЭ предпочтительны ингибитороустойчивые вирусы гриппа, тогда как на основе ингибиторочувствительных вирусов препарат ЖГВ, вероятно, может проявлять большую эффективность. Поскольку при работе в системе РКЭ не представляется возможным влиять на появление адаптивных к новому хозяину мутаций, необходим обязательный молекулярно-генетический контроль отбора ре-

ассортантов с неизменной антигенной и рецепторной специфичностью. Для серологического подтверждения полного соответствия иммуногенности вакцинного реассортанта эпидемическому вирусу необходим антиген на основе исходного эпидемического изолята, накопленного в культуре клеток млекопитающих, и сыворотка к нему. Об обеспечении такими диагностическими наборами необходимо ставить вопрос перед ВОЗ. Обязателен также контроль *ts/ca* фенотипа реассортантов, поскольку теоретической возможности возникновения супрессорных мутаций исключать нельзя, хотя многолетние исследования ЖГВ таких мутаций никогда не выявляли.

Температурочувствительные, а иногда и холодоустойчивые вирусы гриппа продолжают оставаться этиологическими агентами эпидемического процесса. Случается, что возбудителями сезонной заболеваемости становятся вирусы, обладающие *ts/non-ca*, *non-ts/ca* и даже *ts/ca* фенотипом. Большая доля вирусов гриппа А(Н3N2) и В/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. 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. В подобных ситуациях при получении реассортантов для живой гриппозной вакцины возникают определенные сложности.

Характеристика эпидемических вирусов по фенотипическим особенностям позволила предложить наиболее рациональные методические приемы для успешного получения вакцинных реассортантов. Такие приемы важно использовать в работе при получении штаммов ЖГВ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб, Наука, 1994.
2. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Drieszen-van der Cruijisen S.K.M., Heldens J.G.M., Van den Bosch J.F., Руденко Л.Г. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины А и В. ЖМЭИ. 2010, 6: 41-47.
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Литвинова О.М., Иванова В.В., Исакова И.Н., Медведева Т.Е., Александрова Г.И., Руденко Л.Г. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа. Медицинский академический журнал. 2002, 2 (3): 49-57.
4. Киселева И.В., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Ларионова Н.В., Дубровина И.А., Бердыгулова Ж.А., Баженова Е.А., van den Bosch H., Heldens J.G.M., Руденко Л.Г. Анализ состава генома штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011, 4: 29-36.
5. Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975-1976 гг. Вопр. вирусол. 1979, 4: 430.
6. Руденко Л.Г., Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова-Сивак И.Н. Живая гриппозная вакцина, итоги разработок и перспективы применения. Медицинский академический журнал. 2010, 10 (4): 235-239.
7. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. Resp Virus. 2008, 2 (6): 193-202.
8. Couceiro J.N., Paulson J.C., Baum L.G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Res. 1993, 29 (2): 155-165.
9. Chu C.M., Tian S.F., Ren G.F. et al. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature. J. Virol. 1982, 41 (2): 353-359.

10. Gambaryan A.S., Robertson J.S., Matrosovich M.N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology*. 1999, 258 (2): 232-239.
11. Kiseleva I.V., Larionova N.V. Bazhenova E.A., Fedorova E.A., Dubrovina I.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to serum inhibitors and reassortment efficiency. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014, 29 (3): 130-138.
12. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.* 1998, 72 (8): 6373-6380.
13. Oxford J.S., Corcoran T., Schild G.C. Naturally occurring temperature-sensitive influenza A viruses of the H1N1 and H3N2 subtypes. *J. Gen. Virol.* 1980, 48 (2): 383-389.
14. Oxford J.S., Öberg Bo. Conquest of viral disease: a topical review of drug and vaccines. Netherlands, Elsevier, 1985.
15. Peetermans J. Live influenza virus vaccines and preparation thereof. US patent. 1976, #3953592.
16. Robertson J.S., Nicolson C., Bootman J.S. et al. 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. Gen. Virol.* 1991, 72 (11): 2671-2677.
17. Smorodintsev A.A., Alexandrova G.A., Chalkina O.M., Selivanov A.A. *Applied Virology*. Ed. M. Saunders, E.H. Lennette. 1-st Annual Symposium. Boca Raton, Florida, 1964, Sheboygan, Wisconsin, Ellis, 1965: 142.
18. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2013, 88: 101-114.

*Поступила 20.11.18*

Контактная информация: Ларионова Наталья Валентиновна, д.б.н.,  
197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 12, р.т. (812)234-4292

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.В.Сорокина<sup>1,2</sup>, Н.Г.Сивакова<sup>1</sup>, Э.А.Ахматова<sup>1</sup>, Н.Н.Митрофанова<sup>3</sup>, С.А.Сходова<sup>1</sup>, Н.К.Ахматова<sup>1</sup>*

## **ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Академия постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, Москва; <sup>3</sup>Медицинский институт Пензенского государственного университета

*Цель.* Изучение триггерных факторов при хронической крапивнице, особенностей в экспрессии Толл-подобных рецепторов, клинико-иммунологической эффективности применения микробных антигенов у больных хронической крапивницей. *Материалы и методы.* Были обследованы больные хронической крапивницей (134 пациента 18 — 60 лет). Изучение экспрессии TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 на клетках крови проводили с помощью проточной цитометрии; 62 больных получали поливалентный бактериальный лизат (ПБЛ) per os на фоне базисной терапии, 72 больных — монотерапию базисными препаратами. *Результаты.* У больных с бактериальной инфекцией выявили высокий уровень экспрессии TLR2, TLR4. При наличии вирусных инфекций наблюдали высокие значения экспрессии TLR3. Применение ПБЛ способствовало повышению числа больных с клинической ремиссией, снизило степень активности крапивницы, привело к коррекции показателей TLR2 и TLR4, снизило уровень общего IgE. *Заключение.* Включение в комплекс терапевтических и профилактических мероприятий у больных крапивницей хронической препарата на основе микробных антигенов (поливалентного бактериального лизата) способствует повышению клинической эффективности и активации звеньев врожденного иммунитета.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 34—39

Ключевые слова: крапивница хроническая, Толл-подобные рецепторы, поливалентный бактериальный лизат