

Особенности иммунного ответа мышей, иммунизированных различными типами кандидатов в живые гриппозные вакцины, на инфекцию, вызванную вирулентным штаммом вируса гриппа

С.Г. Маркушин (s.g.markushin@rambler.ru), В.Ю. Кост, А.А. Ртищев, И.И. Аكوпова, И.Б. Коптяева, К. В. Лисовская

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва

Резюме

Мышей иммунизировали интраназально двумя типами кандидатов в живые гриппозные вакцины. Она вакцина содержит холодоадаптированные (ХА) реассортанты, унаследовавшие 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и 2 гена, кодирующих поверхностные белки HA и NA вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1), вторая – сайт-специфические мутанты на базе штамма А/WSN/33 (H1N1), в геном которых были включены мутации из генов ХА штаммов вируса гриппа, кодирующих белки полимеразного комплекса. Иммунизированные мыши были затем инфицированы вирулентным штаммом вируса гриппа А/WSN/33. Показано, что оба вида вакцин обладали высокой защитной эффективностью. Однако животные, иммунизированные ХА реассортантной вакциной, резко теряли вес после заражения вирулентным штаммом вируса гриппа, в то время как заражение сходной дозой вирулентного штамма вируса гриппа животных, иммунизированных вакциной с сайт-специфическими мутантами, вызвало незначительное снижение веса.

Ключевые слова: вирус гриппа, холодоадаптированные живые гриппозные вакцины, холодоадаптированные (ХА) реассортанты, сайт-специфические мутанты, иммунизация, фенотипические признаки

Special Features of Immune Answer of Mice, Immunized by Different Types of Live Influenza Vaccines Candidate on Infection, Caused by Virulent Influenza Strain

S. Markushin (s.g.markushin@rambler.ru), W. Kost, A. Rtischev, I. Akopova, I. Koptyeva, K. Lisovskaya
Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

Abstract

Relevance. Live influenza vaccines are highly effective and currently used in the Russian Federation and the United States.

Goal. To investigate especial features of immune response of mice, immunized by different types of live influenza vaccines and infected later by virulent influenza strain.

Materials and methods. Mice were immunized by two types of live influenza vaccines candidate: cold-adapted (CA) reassortant, which inherited the 6 «internal» genes from the CA donor A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) and 2 genes encoding the surface proteins HA and NA from the virulent strain A/WSN/33 (H1N1) and site-specific mutants on the basis of A/WSN/33 strain, in the genome of which has been included mutations from genes of CA strains of influenza virus, encoding proteins of the polymerase complex. Immunized mice were then infected by a virulent A/WSN/33 strain of influenza virus.

Results. It was shown that CA reassortant RKr35 /WSN/33 and site-specific mutants Tr. № 5 and № 8 in contrast to the virulent A/WSN/33 strain were characterized by pronounced ts-phenotype and att-phenotype. Both types of live vaccines after two-time intranasal immunization induced in mice a relatively low level of humoral antibodies ($\log_2 4,5 \pm 1,2 - \log_2 6,0 \pm 0,7$). Despite the low level of induction of humoral response both types of live vaccines had similar marked protective efficiency. However, animals immunized with CA reassortant was characterized by a significant weight loss after infection with a virulent influenza strain (25%), while the infection of animals, immunized with site-specific mutants, by a similar dose of virulent flu strain has very little impact on their weight characteristics (8 – 13%).

Conclusion. The data obtained indicate that antibodies to surface proteins of the virion, induced in the process of immunization, slightly inhibited the initial replication of the virulent strain and suggest that these differences in the symptoms of the infection depend on the characteristics of activated T-cell immunity. This circumstance could have a significant impact on metabolic processes in organism of infected animals.

Key words: influenza virus, cold-adapted live influenza vaccines, site-specific mutants, immunization, phenotypic markers

Введение

Живые гриппозные вакцины обладают высокой эффективностью при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей. Используемые в настоящее

время в Российской Федерации и США холодоадаптированные (ХА) гриппозные вакцины представляют собой реассортанты, геном которых содержит 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора аттенуации

Таблица 1.

ts-фенотип и att-фенотип штамма A/WSN/33, ХА штамма A/Краснодар/101/35/59, ХА реассортанта R Kr₃₅/WSN/33, и сайт-специфических мутантов Тр. № 5 и Тр. № 8 штамма A/WSN/33

Исследуемые вирусные варианты	Титр вирусосодержащей жидкости в куриных эмбрионах (lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл) 34 °С; 38 °С; 39 °С	Титр вируса в легких мышей (lgЭИД ₅₀ /0,2мл)
A/WSN/33 (H1N1)	6,5 ± 0,32; 6,5 ± 0,25; 6,25 ± 0,4	5,0 ± 0,4
A/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	7,5 ± 0,4; 1,0 ± 0,5; < 1,0	< 1,0
Реассортант R Kr ₃₅ /WSN/33*	7,5 ± 0,5; 2,0 ± 0,5; < 1,0	< 1,0
Тр. № 5. PB1** A/Кр ₃₅ (H147 Thr)*** PA A/WSN/33 (F658A)	6,0 ± 1,0; 3,0 ± 0,8 < 1,0	< 1,0
Тр. № 8. PB1 A/AA (K391E, E581G, E457D) PB2 A/Кр ₃₅ (V 290 L) PA A/WSN/33 (F658A)	5,5 ± 0,35; 3,5 ± 1,0; < 1,0	< 1,0

Примечание: *Название штамма: A/WSN/33, A|AA – A/Энн Арбор/6/60, A/Кр₃₅ – A/Краснодар/101/35/59.

Полимеразный ген. *Локализация мутации.

Различия между величинами титров размножения исследуемых вирусов в куриных эмбрионах и легких мышей статистически достоверны при $p < 0,05$.

и 2 гена, кодирующие поверхностные белки гемагглютинин и нейраминидазу антигенно-актуального эпидемического штамма гриппа. Они успешно используются в практике здравоохранения на протяжении последних десятилетий. Однако возможен другой подход к получению живых гриппозных вакцин, предполагающий, в первую очередь, прямое включение заранее известных и изученных ts- мутаций, взятых из геномов ХА штаммов-доноров аттенуации, в геном вирулентного штамма вируса гриппа [1 – 4]. Полученные таким образом сайт-специфические мутанты обладают определенным потенциалом защитной эффективности против гриппа [4 – 6]. Вместе с тем накопленные экспериментальные данные не дают полного представления о сравнительной защитной эффективности типов вакцин, полученных с помощью того или иного метода, а также об особенностях иммунного ответа при их использовании.

Цель данной работы – изучение особенностей иммунного ответа мышей, иммунизированных живыми гриппозными вакцинами, полученными с помощью двух различных подходов, на инфекцию, вызванную гомологичным вирулентным штаммом вируса гриппа.

Материалы и методы

Вирусы

Для проведения данной работы был получен реассортант R Kr₃₅/WSN/33 путем скрещивания ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [7, 8] и вирулентного штамма вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1). Реассортант унаследовал 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора и 2 гена, кодирующих поверхностные белки гемагглютинин и нейраминидазу штамма A/WSN/33.

В работе были использованы сайт-специфические мутанты (трансфектанты) на базе штамма A/WSN/33, в геном которого был включен ряд ts-мутаций. Трансфектант № 5 (Тр. № 5) содержал в геноме ts-мутацию (H147 Thr) из гена PB1

ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 и ts-мутацию F658A из COOH-домена PA-гена штамма A/WSN/33. Трансфектант № 8 (Тр. № 8) имел в геноме ts-мутации из гена PB1 ХА штамма A/Энн Арбор/6/60 (K391E, E581G, E457D), ts-мутацию V290L из PB2-гена ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 и ts- мутацию F658A из COOH-домена PA-гена штамма A/WSN/33. Фенотипические характеристики использованных вирусов представлены в таблице 1.

Куриные эмбрионы

Использованные в работе вирусы и сайт-специфические мутанты поддерживали путем пассажей в 9 – 10 дневных куриных эмбрионах. Активность репродукции вирусов гриппа при разной температуре инкубации оценивали по результатам титрования в куриных эмбрионах, инкубированных при 34 °С, 37 °С, 38 °С, 39 °С и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures – репродуктивная способность при различных температурах). $RCT_{39} = \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2\text{мл}$ при 34 °С – $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$ при 39 °С). Вирусы считались температурочувствительными (ts-фенотип) если RCT_{39} была более 5,0 $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$.

Культуры клеток

В опытах по трансфекции использовали линии клеток 293Т и MDCK (получена из Института Пастера, Франция). Все клетки выращивались при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Клеточные культуры поддерживались на среде MEM (фирма ПанЭко, Москва), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки и гентамицин в количестве 1 мг на 450 мл среды.

Рекомбинантная ДНК и обратно-генетические методы

Плазмиды и бактерии

В экспериментах использовали плазмиду pHW2000 [9], разработанную для получения вируса гриппа методом обратной генетики. Плазмиды со вставками

генов штамма вируса гриппа A/WSN/33 были любезно предоставлены доктором Вебстером (Мемфис, США). Для накопления плазмид использовали штамм *E. coli* DH5alpha.

Накопление и концентрирование вирусов

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием. Аллантаисную жидкость, содержащую вирионы, осаждали в центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-14) при 6000 об/мин в течение 30 мин для осаждения клеточного дебриса. Вирус осаждали из надосадочной жидкости на центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-14) при 14 000 об/мин в течение 2,5 час. Осадок вирионов ресуспендировали в буфере STE (10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) в гомогенизаторе Даунса.

Выделение вирусной РНК

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

ОТ-PCR

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

Клонирование в *E.coli*

Опыты по клонированию (работа с бактериями, рестрикция, лигирование и т.п.) проводили по стандартным методикам или в соответствии с рекомендациями производителя для соответствующих ферментов (T4-лигаза, рестриктазы Esp 31 и Eco 311).

Секвенирование

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

Трансфекция

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) либо в кокультуре клеток 293T и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293T (плотность клеточного монослоя около 70%) в соответствии с методикой, прилагаемой к реагенту Lipofectamine LTX. В качестве отрицательного контроля использовали монослой клеток с липофектаминами и без плазмид. В качестве положительного контроля к культуре клеток добавляли восемь плазмид, содержащих все гены исходного штамма A/WSN/33. В ряде экспериментов

через 48 часов после трансфекции материал вводили в куриные эмбрионы. Клетки снимали трипсином, после чего добавляли по 0,5 мл неразведенной суспензии в куриные эмбрионы. Через 48 часов определяли титр гемагглютинаина вируса в куриных эмбрионах.

Изучение репродукции вирусов в легких мышей

Изучение att-фенотипа проводили по следующей методике: группы самок беспородных мышей (по 5 – 10 особей в группе) инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом анализируемыми вирусами (в дозе 50 мкл на мыш). Через 72 часа мышей усыпляли и извлекали легочную ткань. Из легочной ткани готовили 10%-ю суспензию в ступках с тертым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10%-й суспензии легких определяли в куриных эмбрионах и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трех независимых опытах в группах по 5 – 10 мышей на каждый анализируемый вирус.

Получение ХА реассортанта между ХА штаммом донором А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентным штаммом А/WSN/33 (H1N1)

Реассортант R Kr₃₅/WSN/33 был получен методом рекомбинации (кросс-реактивации), описанным Ф.И. Полежаевым с сотр. [10] и модифицированным в нашей лаборатории. Вирусосодержащую аллантаисную жидкость разводили средой MEM 1:10 и вносили в чашки Петри. Инактивацию вируса осуществляли с помощью УФ-установки, снабженной УФ-лампой G8W T5, Germicidal 288 mm. Инфицированные штаммом R Kr₃₅/WSN/33 и облученным штаммом A/WSN/33 куриные эмбрионы инкубировали в течение 18 часов при 32 °С. Затем аллантаисную жидкость отсасывали и пассировали дважды в куриных эмбрионах в присутствии анти-сыворотки к серотипу H2N2 при 26 °С. Полученные реассортанты клонировали в куриных эмбрионах методом предельных разведений. Анализ генома реассортанта проводили методом секвенирования с использованием специфических праймеров к последовательностям генов вируса гриппа серотипов H1N1 и H2N2 [8]. Результаты секвенирования генома реассортанта показали, что он унаследовал 6 генов от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и 2 гена, кодирующих белки HA и NA вирулентного штамма А/WSN/33.

Мукозальная иммунизация животных

При мукозальной иммунизации мышам под легким эфирным наркозом вводили интраназально 50 мкл вирусного материала двукратно с интервалом в 21 день. Через 10 дней после второй иммунизации у мышей брали кровь и затем препарировали, извлекая легочную ткань. Анализ специфических ингибирующих гемагглютинацию антител проводили согласно МУ 3.3.2.1758-03. За титр сыворотки принимали

Таблица 2.
Изучение иммуногенности ХА реассортанта R Kr35/WSN/33, ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 и сайт специфических мутантов штамма А/WSN/33

Иммунная сыворотка	Обратные титры вирусспецифических антител ($\log_2 \pm \text{CCO}$) в сыворотках крови мышей на 28-й день после инфекции в РТГА			
	Антигены			
	ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	ХА реассортант R Kr ₃₅ /WSN/33	Трансфек-тант № 5	Трансфек-тант № 8
ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	4,5 ± 1,2			
ХА реассортант R Kr ₃₅ /WSN/33		5,1 ± 0,5		
Тр. № 5. PB1 А/Кр ₃₅ (II 147 Thr) РА А/WSN/33 (F658А)			6,0 ± 0,7	
Тр. № 8. PB1 А/АА (K391E, E581G, E457D), PB2 А/Кр ₃₅ (V 290 L), РА А/WSN/33 (F 658 А)				4,9 ± 1,2

Примечание: Различия между величинами обратных титров гемагглютинин-ингибирующих антител, индуцированных исследуемыми вирусами гриппа статистически достоверны при $p < 0,05$.

предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

Определение защитной эффективности двух типов кандидатов в живые гриппозные вакцины

Для определения защитной эффективности анализируемых вакцин мышей одной группы иммунизировали интраназально под легким эфирным наркозом ХА реассортантом R Kr₃₅/WSN/33 и мышей другой группы сайт-специфическими мутантами в инфекционном титре $10^{5,0}$ ЭИД₅₀ (по 50 мкл на мышь). Затем через 21 день мышей иммунизировали повторно. По прошествии 10 дней мышей инфицировали интраназально вирулентным штаммом А/WSN/33 и через 3 дня из мышей извлекали легочную ткань и определяли репродукцию вируса в легких.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием среднего квадратичного отклонения.

Результаты и обсуждение

1. Изучение фенотипических характеристик ХА реассортанта R Kr35/WSN33 и сайт-специфических мутантов

Ts (temperature sensitive – чувствительность к температуре) служит одним из важнейших маркеров аттенуации для штаммов – кандидатов в живые гриппозные вакцины. В этой связи этот маркер был изучен у всех исследованных нами вирусов. Как видно из таблицы 1, вирулентный штамм А/WSN/33(H1N1) практически одинаково размножался при 34 °С и 38 °С. При температуре 39 °С наблюдалось только незначительное снижение инфицирующего титра данного вируса. ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 почти полностью утратил способность к размножению в куриных эмбрионах при температуре 38 °С ($\lg 1,0 \pm 0,5$ ЭИД₅₀/0,2мл) и полностью при 39 °С. Таким образом этот штамм

обладал выраженным ts-фенотипом. Реассортант R Kr₃₅/WSN/33, полученный при скрещивании ХА штамма и штамма А/WSN/33, имел выраженную способность к размножению при 34 °С, очень плохо размножался при 38 °С и полностью терял эту способность при 39 °С и ($\lg 2,0 \pm 0,5$ ЭИД₅₀/0,2 мл).

Полученные нами сайт-специфические мутанты хуже, чем реассортанты размножались в куриных эмбрионах. Сайт-специфический мутант Тр. № 5, получивший в геноме замену IL1 47 Thr из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 и замену F 658 А в РА-гене, полностью утерел способность к размножению в куриных эмбрионах при 39 °С и значительно снизил способность к размножению при 38 °С. Второй сайт-специфический мутант Тр. № 8, имеющий ts- мутации во всех 3 генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, также утерел способность к размножению в куриных эмбрионах при 39 °С и плохо размножался при 38 °С.

Изучение att-фенотипа вирулентного штамма А/WSN/33 (см. табл. 1) показало, что данный штамм активно размножался в легких мышей ($\lg 5,0 \pm 0,4$) при интраназальном заражении в отличие от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, который полностью утерел вирулентность для мышей. Реассортант R Kr₃₅/WSN/33 в этом отношении имел полное сходство с ХА штаммом. Оба сайт-специфических мутанта характеризовались полным отсутствием размножения в легких мышей. Как видно из наших данных, полученные нами ХА реассортант R Kr₃₅/WSN/33 и сайт-специфические мутанты Тр. 5 и Тр. 8 обладали примерно сходными фенотипическими признаками.

2. Изучение иммуногенности ХА реассортанта R Kr35/WSN/33 и сайт-специфических мутантов

На следующем этапе нашей работы мы попытались выяснить, могут ли полученные нами аттенуированные вирусные варианты со сниженной

Таблица 3.
Защитная эффективность ХА реассортанта R Kr35/WSN/33 и сайт-специфических мутантов (трансфектантов № 5 и № 8) штамма A/WSN/33

Варианты вируса гриппа , используемые для иммунизации	Титр вирулентного штамма A/WSN/33 в легких иммунизированных мышей (Ig ЭИД ₅₀ /0,2мл)
ХА реассортант R Kr ₃₅ /WSN/33	< 1,0
Тр. № 5 PB1 A/Kp ₃₅ (IL 147 Thr) РА A/WSN/33 (F 658 A)	< 1,0
Тр. № 8 PB1 A/AA (K391E, E581G, E457D) PB2 A/Kp ₃₅ (V290L) РА A/WSN/33 (F658A)	< 1,0

способностью к размножению в легких мышей индуцировать достаточно высокий гуморальный иммунитет при их интраназальном введении мышам. Наличие защитного титра гуморальных антител позволило бы рассматривать их в качестве возможных кандидатов для живых гриппозных вакцин. Мыши были иммунизированы интраназально двукратно в дозе 10^{5,0} ЭИД₅₀ анализируемыми вирусами. Через 10 дней после второй иммунизации у мышей брали кровь и определяли титр гемагглютинирующих антител. Как видно из таблицы 2, все исследованные вирусы при интраназальной двукратной иммунизации индуцировали у мышей сравнительно невысокий уровень гуморальных антител (log₂ 4,5 ± 1,2 – log₂ 6,0 ± 0,7).

3. Изучение эффективности защитных свойств ХА реассортанта R Kr35/WSN/33 и сайт-специфических мутантов

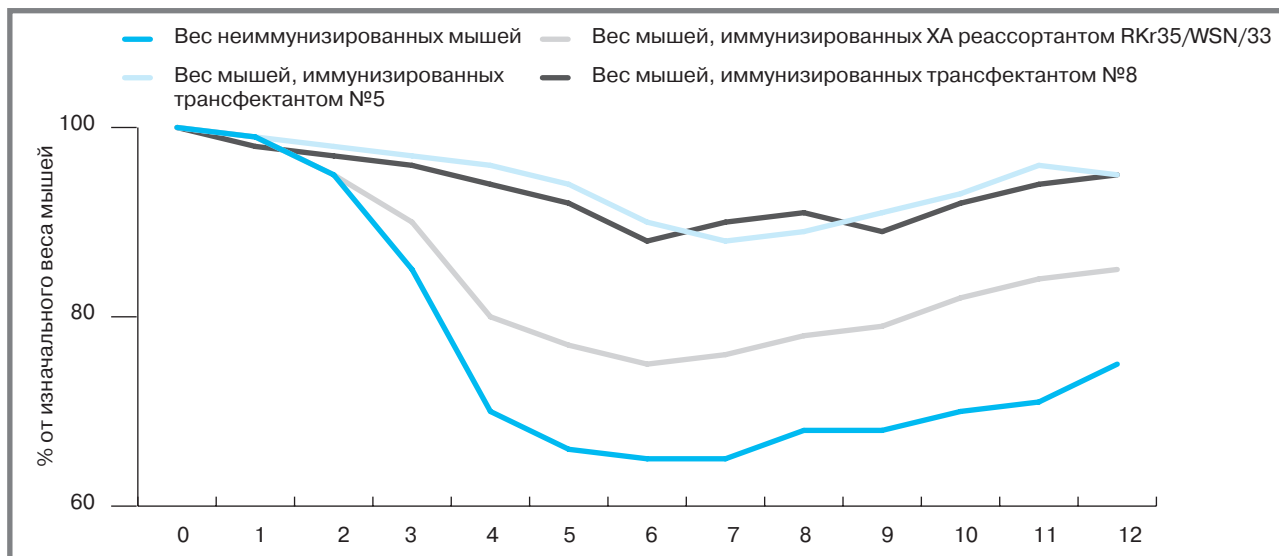
Для сравнения защитной эффективности ХА реассортанта R Kr35/WSN/33 и сайт-специфических мутантов мышам дважды вводили интраназально исследуемые вирусы в дозе 10^{5,0} ЭИД₅₀ с последующим инфицированием вирулентным штаммом A/WSN/33 в дозе 10^{3,0} ЭИД₅₀. Через 72 часа мышам забивали, извлекали легочную ткань и готовили из нее 10% суспензию.

Суспензию титровали в куриных эмбрионах. Титр вирулентного штамма в легких при заражении невакцинированных мышей составлял 10^{4,0} ЭИД₅₀/0,2 мл. В легких мышей, иммунизированных ХА реассортантом R Kr₃₅/WSN/33, вирусного размножения не было отмечено. Аналогичная картина наблюдалась и в легких мышей, которым вводили сайт-специфические мутанты Тр. № 5 и Тр. №8. Представленные в таблице 3 данные свидетельствуют о том, что полученные нами вирусные варианты, несмотря на невысокий уровень индукции гуморальных антител, обладают приемлемой защитной эффективностью и не различаются по этому признаку.

4. Изучение весовых характеристик иммунизированных мышей, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33

Мыши, инфицированные интраназально вирулентным штаммом A/WSN/33, быстро и значительно теряли вес. На 6 –7 сутки после инфицирования падение веса инфицированных мышей может достигать 30 – 35% от первоначального веса. При этом на 8 – 9 сутки после инфицирования наблюдается гибель части животных. В задачу нашего исследования входило изучение весовых характеристик мышей, иммунизированных получен-

Рисунок 1.
Изучение весовых характеристик мышей, иммунизированных вакцинными штаммами вируса гриппа и затем инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33



Эпидемиология и Вакцинопрофилактика № 5 (90)/2016

ными вакцинными вариантами штамма A/WSN/33 и затем инфицированными вирулентным штаммом A/WSN/33.

Как видно на рисунке 1, у неиммунизированных мышей, инфицированных интраназально штаммом A/WSN/33 в дозе $10^{5.0}$ ЭИД₅₀ наблюдалась быстрая потеря веса (на 6 – 7 сутки достигала 35% от первоначального веса). У иммунизированных вакцинными вариантами штамма A/WSN/33 мышей после инфицирования вирулентным штаммом A/WSN/33 падение веса было различным. У мышей, инфицированных сайт-специфическими мутантами Тр. № 5 и Тр. № 8 вес падал незначительно. У мышей, иммунизированных трансфектантом № 5 снижение веса на 6 – 8 сутки после инфицирования не превышало 10 – 13%, аналогичная картина была и у мышей, иммунизированных трансфектантом № 8 (8 – 12%).

Однако у мышей, иммунизированных ХА реассортантом R Kr₃₅/WSN/33 происходило более значительное падение веса после инфицирования вирулентным штаммом A/WSN/33. На 6 – 7 сутки после инфекции снижение веса мышей достигало 25% ($p > 0,05$). На протяжении дальнейшего срока наблюдения отмечалось постепенное восстановление веса животных.

Изучение особенностей иммунного ответа, вызываемого двумя типами исследуемых нами вакцинных вариантов вируса гриппа имеет важное значение с точки зрения выбора оптимальной стратегии применения живых вакцин для профилактики гриппа. Как показали наши исследования, фенотипические характеристики ХА реассортанта, полученные путем скрещивания ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с вирулентным штаммом A/WSN/33 (H1N1) и сайт-специфических мутантов, полученных путем прямого включения аттенуирующих мутаций в геном штамма A/WSN/33 незначительно отличались между собой. Титры индуцированных гуморальных антител в крови иммунизированных животных и защитная эффективность вакцинных вариантов, полученных разными методами, также были сходны. Однако у мышей, иммунизированных различными типами живых гриппозных вакцин, наблюдалась неодинаковая интенсивность падения веса после их инфицирования вирулентным штаммом A/WSN/33. Потеря веса после инфицирования вирулентным штаммом A/WSN/33 у мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами, была почти в два раза меньше, чем у мышей, иммунизированных ХА реассортантом. Аналогичный феномен наблюдался группой китайских исследователей [4], когда было обнаружено, что мыши, имму-

низированные сайт-специфическим мутантом NY1682-TS2 имели незначительную потерю веса (максимально 16% на 5-й день инфекции) и все они выжили после инфекции вирулентным вирусом. В противоположность этому, мыши, иммунизированные ХА реассортантом, на базе ХА штамма A/Энн Арбор/6/60, и имеющим только 2 гена, кодирующих поверхностные белки от пандемического штамма NY1682 (H1N1), вес снижался значительно. При этом отмечены сходные титры размножения вирусов в легких. Этот факт свидетельствует о том, что антитела к ХА- и NA-белкам, индуцированные в процессе иммунизации, незначительно ингибировали начальную репликацию антигенно-неродственного вирулентного штамма и дают основание полагать, что эти различия в симптомах инфекции у мышей зависят от особенностей активации Т-клеточного иммунитета. Последнее обстоятельство, как мы видим, может значительно повлиять на степень нарушения метаболических процессов в организме инфицированных животных, и в конечном счете отразиться на падении их веса. Полученные данные свидетельствуют о возможной взаимосвязи иммунного ответа с метаболическими процессами в организме инфицированных животных. При этом иммунизация сайт-специфическими мутантами приводит к менее выраженным нарушениям метаболических процессов в процессе последующей гриппозной инфекции.

Выводы

1. ХА реассортант R Kr₃₅/WSN/33 и сайт-специфические мутанты штамма A/WSN/33 (Трансфектанты № 5 и № 8) обладали сходными фенотипическими характеристиками (ts- и att-фенотип). Оба типа вакцинных препаратов индуцировали относительно низкий уровень гуморальных антител, но характеризовались приемлемой эффективностью защиты.
2. Мыши, иммунизированные сайт-специфическими мутантами, демонстрировали невысокую потерю веса после инфекции вирулентным штаммом вируса гриппа. Однако у животных, иммунизированных ХА реассортантом, в процессе последующего инфицирования вирулентным штаммом вируса гриппа наблюдалось значительное падение веса.
3. Полученные данные свидетельствуют о возможной взаимосвязи иммунного ответа с метаболическими процессами в организме инфицированных животных. При этом иммунизация сайт-специфическими мутантами приводит к менее выраженным нарушениям метаболизма в процессе последующей гриппозной инфекции. ■

Литература

1. Hickman D., Hossain J., Song H., Araya, Y., Solorzano, A., Perez, D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. J. Gen. Virol. 2008, 89: 2682 – 2690.

- Solorcano A., Ye J., 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.
- Pena L., Vincent A., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A. et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011, 85 (1): 456 – 469.
- Zhou B., Li Yo., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012, 30 (24): 3691 – 3702.
- Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997, 71 (4): 2772 – 2778.
- Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. 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.
- Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова И.И., Ахматова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии.* 2013; 1: 11 – 17.
- Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Кост Н.В. Генетические основы аттенуации холодоадаптированного штамма A(H2N2)/Краснодар/101/35/59 – донора для живых гриппозных вакцин. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2013, 3 (70): 70 – 77.
- Hoffmann E., Neumann G., Hobom G., Webster R.G. Ambisense approach for K.B. the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology.* 2000, 267 (2): 310 – 317.
- Polezhaev F.I., Garmaschova L.M., Polykov Y.M., Golubev D.B., Aleksandrova G.I. The conditions of influenza virus ts- recombinants development. *Acta virol.* 1978, 22: 263 – 269.

References

- Hickman D., Hossain J., Song H., Araya Y., Solorzano A., Perez D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008, 89: 2682 – 2690.
- Solorcano A., Ye J., 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.
- Pena L., Vincent A., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A. et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011, 85 (1): 456 – 469.
- Zhou B., Li Yo., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012, 30 (24): 3691 – 3702.
- Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997, 71 (4): 2772 – 2778.
- Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. 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.
- Ghendon Y.Z., Markushin S.G., Tsfasman T.M., Akopova I.I., Akhmatova N.K., Koptyaeva I.B. New cold-adapted strains-donors of attenuation for live influenza vaccines. *Voprosi virusologii [Problems of Virology]* 2013; 1: 11 – 17 (in Russian).
- Terechov A.V., Tsfasman T.M., Markushin S.G., Koptyaeva I.B., Lisovskaya K.V., Kost N.V. Genetic bases of attenuation of cold-adapted (CA) A/Krasnodar/101/35/59(H2N2)strain-donor for live influenza vaccines. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2013, 3 (70)12: 70 – 77 (in Russian).
- Hoffmann E., Neumann G., Hobom G., Webster R.G. Ambisense approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology.* 2000, 267 (2): 310 – 317.
- Polezhaev F.I., Garmaschova L.M., Polykov Y.M., Golubev D.B., Aleksandrova G.I. The conditions of influenza virus ts- recombinants development. *Acta virol.* 1978, 22: 263 – 269.

ИНФОРМАЦИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии

Методические рекомендации МР 4.2.0114-16 (Выдержки)

< ... >

Внебольничной пневмонией (ВП) считают заболевание, возникшее во внебольничных условиях (вне стационара или позднее 4 недель после выписки из него) или диагностируемое в первые 8 часов с момента госпитализации, а также развивающееся у пациента, не находившегося в домах сестринского ухода длительного медицинского наблюдения более 14 суток.

По данным федерального статистического наблюдения (форма №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») за 2011 – 2015 годы заболеваемость ВП в России находилась на уровне 310-380 на 100 тыс. населения (600 – 750 на 100 тыс. детей в возрасте до 14 лет).

У отдельных категорий граждан, в частности у военнослужащих срочной службы, медицинских работников заболеваемость пневмококковыми пневмониями превышает уровень заболеваемости среди населения в целом.

Показатель смертности при ВП в 2011 – 2014 годах составлял 2,9 – 3,9 на 100 тыс. населения (у детей в возрасте до 14 лет – 0,3 – 0,4 на 100 тыс. контингента). В структуре младенческой смертности заболевания органов дыхания стоят

на третьем месте (около 7%), из них около 74% приходится на пневмонии.

Этиологическая структура ВП может различаться в зависимости от возраста пациентов, тяжести заболевания и наличия сопутствующей патологии. По зарубежным данным пневмококковые пневмонии диагностируют у 5% взрослых амбулаторных пациентов, 17,3% госпитализированных в терапевтические отделения и 21% – в отделения интенсивной терапии. В Российской Федерации по расчетным данным некоторых авторов частота пневмококковых пневмоний у детей в возрасте от 1 мес. до 15 лет составляет 490 на 100 тыс. детского населения соответствующего возраста, в возрасте от 1 мес. до 4 лет – 1060.

Дети первых лет жизни являются основными источниками пневмококковой инфекции, заражая окружающих взрослых. Так, при средней частоте носительства у взрослых в 5 – 7%, среди взрослых, проживающих с детьми, она может достигать 30%.

По данным отчетной формы государственного статистического наблюдения в России (ф-2), пневмококковая этиология ВП подтверждается лишь в 1,3 % случаев.

Источник: www.rospotrebnadzor.ru