

ТРАНСМИССИВНОСТЬ ВИРУСА ГРИППА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

КИСЕЛЕВА И. В., ЛАРИОНОВА Н. В., БАЖЕНОВА Е. А., ДУБРОВИНА И. А.,
ИСАКОВА-СИВАК И. Н., ГРИГОРЬЕВА Е. П., ДОНИНА С. А., РУДЕНКО Л. Г.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,
Санкт-Петербург

Киселева И. В., Ларионова Н. В., Баженова Е. А., Дубровина И. А., Исакова-Сивак И. Н., Григорьева Е. П., Донина С. А., Руденко Л. Г. Трансмиссивность вируса гриппа (экспериментальные данные) // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. № 4. С. 240–248. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Трансмиссивность вируса гриппа играет ключевую роль в распространении эпидемических и пандемических штаммов. Раскрытие механизмов, лежащих в основе трансмиссивности, позволит более эффективно контролировать грипп и изыскивать новые пути и методы его профилактики. На сегодняшний день наиболее эффективным методом защиты от гриппа является вакцинопрофилактика. Поэтому не менее важен вопрос о возможности распространения среди населения штаммов живой гриппозной вакцины с их последующей реассортацией с циркулирующими вирусами. В настоящем исследовании на модели морских свинок проведено сравнительное изучение возможности передачи «диких» и холодоадаптированных вирусов гриппа незараженным животным. Показано, что вирус гриппа H5N1 является высоко трансмиссивным агентом, передающимся не только контактным животным, но и особям, находящимся от них на значительном расстоянии. По сравнению с ним новый пандемический вирус 2009 г. H1N1 не является столь высоко контагиозным для морских свинок. Установлен факт интерференции холодоадаптированных штаммов с вирусами «дикого» типа, что открывает новые перспективы применения живой гриппозной вакцины в пандемической ситуации и подтверждает необоснованность опасений о формировании при массовой вакцинации населения живой вакциной мутантных «вирусов-убийц» с повышенным уровнем патогенности.

Ключевые слова: трансмиссивность, вирус гриппа, живая гриппозная вакцина.

Kiseleva I. V., Larionova N. V., Bazhenova E. A., Dubrovina I. A., Isakova-Sivak I. N., Grigorieva E. P., Donina S. A., and Rudenko L. G. Influenza virus transmission (experimental data) // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 4. P. 240–248. Research Institute of Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, 197376, Russia.

Person-to-person transmission plays key role to seasonal and pandemic influenza virus spread. There is a need to better understand the transmission of influenza viruses so that we may improve methods for their control and prevention. At present, vaccination with live influenza vaccines has been used as an effective public health tool for influenza prophylaxis. Thus study of potential possibility of reassortment of circulating influenza viruses with live influenza vaccine viruses followed by vaccination is extremely important. In this study the ability of pig-to-pig transmission of H5N1 and novel pandemic H1N1 viruses was studied. The efficacy of vaccination with cold-adapted influenza viruses in blocking the transmission of wild type influenza viruses between guinea pigs was also examined. The results shown are H5N1 virus is highly contagious agent which can be transmit both between co-caged naïve guinea pigs and individuals separated from infected animals at a distance of 4–5 meters. The relative mildness of the pandemic 2009 (H1N1) swine influenza virus transmission between guinea pigs compared to H5N1 virus was demonstrated. Data indicated that interference between cold-adapted and wild type influenza viruses had taken place. These findings open up new prospects in live influenza pandemic vaccine preparedness and confirmed weakness of fear that large scale vaccination of population with live attenuated influenza vaccine may lead to generation of reassortant «mutants-killers» possessed abnormally high level of pathogenicity.

Key words: transmission, influenza virus, live attenuated influenza vaccine.

Для корреспонденции: Ларионова Наталья Валентиновна, Отдел вирусологии НИИ ЭМ СЗО РАМН, тел. раб. (812) 234–4292, E-mail: nvlarionova@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – это тяжелая вирусная инфекция, которая поражает людей вне зависимости от возраста и национальности и остается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Заболевания гриппом сопровождаются высокой смертностью, особенно у маленьких детей и пожилых людей [26]. Эпидемии гриппа происходят каждый год и охватывают до 15% населения Земли. Пандемии возникают каждые

10–40 лет. Пандемии 1918, 1957 и 1968 гг. («испанка», которая считается самой крупной пандемией за всю историю человечества, «азиатский грипп» и «гонконгский грипп») по самым приблизительным подсчетам во всем мире вызвали соответственно более 50, 2 и 1 млн летальных исходов. В 2009 г. мир оказался на пороге новой пандемии, вызванной вирусами, подобными А/Калифорния/7/2009 (H1N1) и А/Калифорния/4/2009 (H1N1).

Вирусы гриппа птиц, как правило, не инфицируют людей, однако в 1997 г. в Гонконге был впервые выделен вирус А (H5N1), который инфицировал как кур, так и людей. В ходе этой вспышки 18 человек были госпитализированы и 6 из них погибли [35]. В настоящее время официальный информационный портал Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) регулярно информирует о том, что в Евразии вирусы птичьего гриппа H5N1 продолжают убивать людей и птиц [31]. Таким образом, вирус гриппа H5N1 преодолел межвидовой барьер от птиц к человеку. Однако, несмотря на то, что в литературе уже описаны единичные случаи внутрисемейного заражения гриппом H5N1 [27, 29], это является, скорее, исключением из правил и, к счастью, пока нет доказательств того, что вирус может регулярно передаваться напрямую от человека к человеку. В том случае, если вирус птичьего гриппа приобретет способность инфицировать людей, может начаться пандемия птичьего гриппа. Этот факт подтверждается и тем, что в составе генома вирусов, вызвавших пандемию XX–XXI вв., обязательно присутствовали гены, принадлежащие вирусам гриппа птиц [17].

Три основных свойства вируса гриппа определяют его пандемические потенции: новизна штамма для иммунной системы, вирулентность и способность передаваться от человека к человеку, т. е. трансмиссивность. Именно степень трансмиссивности циркулирующих штаммов определяет тяжесть вызываемых ими пандемий или эпидемий [11].

Несмотря на бесспорно ключевую роль трансмиссивности вируса гриппа в распространении эпидемических и пандемических штаммов, природа и механизмы их контагиозности продолжают обсуждаться. Поэтому существует насущная необходимость глубокого понимания проблемы патогенеза и трансмиссивности вируса гриппа. Раскрытие механизмов, лежащих в основе трансмиссивности, позволит более эффективно контролировать грипп и изыскивать новые пути и методы его профилактики.

В свете вышесказанного основной задачей настоящей работы явилось изучение возможности контактной (прямой) и бесконтактной (непрямой) передачи пандемических и потенциально пандемических штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo*.

Вирус гриппа может передаваться от человека к человеку тремя основными путями: в результате непосредственного контакта с больными гриппом, путем аэрозольной передачи вирусных частиц или в результате контакта с контаминированными вирусом объектами. В настоящем исследовании сделана попытка моделирования первых двух возможностей как играющих главную роль в распространении гриппа.

В последние годы живая гриппозная холодоадаптированная вакцина (ЖГВ) как средство защиты от сезонного и пандемического гриппа заняла лидирующее положение в мире среди других профилактических противогриппозных средств. Поэтому не менее важно решение периодически поднимающегося в прессе [2, 4] вопроса о возможности распространения среди населения штаммов живой гриппозной вакцины с их последующей реассортацией с циркулирующими вирусами. Это, по мнению авторов таких статей, может привести к формированию мутантного вируса с особо опасными свойствами.

В этой связи другой задачей настоящего исследования явилось изучение возможности передачи холодоадаптированных (ХА) аттенуированных вирусов гриппа незараженным животным или животным, предварительно инфицированным «дикими» вирусами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

«Дикие» вирусы гриппа. В работе использовали пандемический штамм 2009 г. А/Калифорния/7/2009 (H1N1), полученный в Центре по контролю заболеваемости (CDC, Атланта, Джорджия, США, ID №2009712112) и полученный из коллекции NIBSC (Великобритания, ID №08/156) вирус NIBRG–23 (H5N1), – реассортантный штамм для инактивированной вакцины, содержащий гены HA и NA от высокопатогенного вируса гриппа птиц А/индюк/Турция/1/05 (H5N1) с модифицированным кливедж-сайтом гена гемагглютинина, а гены, кодирующие внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M и NS), – от высокоурожайного донора А/PR/8/34 (H1N1).

Холодоадаптированные вирусы гриппа. В работе использовали реассортантный вакцинный штамм пандемической гриппозной вакцины А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), используемый для приготовления штаммов живой гриппозной реассортантной вакцины, и живую гриппозную вакцину, в состав которой входили реассортантные вакцинные штаммы А/17/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2) и В/60/Джилин/03/1, подготовленные на основе «диких» вирусов, рекомендованных ВОЗ на эпидемический сезон 2004–2005 гг.

Животные. Морские свинки (самки-альбиносы) весом 300–350 г., полученные из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленобласть, Всеволожский район, дер. Рапполово). Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [3]. Животных содержали при температуре 22 °С и относительной влажности 25%.

Контингент. В исследовании принимали участие дети 3–6 лет, посещающие детские дошкольные учреждения. В эпидемический сезон 2004–2005 гг. 24 ребенка были привиты однократно коммерческой живой гриппозной тривакциной. 28 детей, находящихся в тесном контакте с привитыми, получили препарат «плацебо». Выделение вирусов из носовых ходов детей проводили через 2, 3 и 4 дня после введения препарата параллельно в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK по стандартным методикам [32]. Наличие вируса определяли по положительной реакции гемагглютинации с 1% эритроцитами человека группы 0(I), Rh⁺. При отрицательном результате РГА проводили два «слепых» пассажа исследуемого материала. Забор крови для РТГА проводился до вакцинации и через 21 день после вакцинации.

Выделение изолятов от животных проводилось в развивающихся куриных эмбрионах по стандартным методикам [32]. Серологическое подтверждение трансмиссивности вируса гриппа в экспериментах *in vivo* проводили через 4 и 8 нед после заражения по стандартной методике РТГА [32] с 1% эритроцитами человека группы 0(I), Rh⁺. Все выделенные вирусы также типировали в РТГА со специфическими крысиными антисыворотками и с помощью стандартного метода RFLP RT-PCR [9]. Фенотипический анализ изолятов (температуро- и холодочувствительность репродукции) проводили в куриных эмбрионах по методу, описанному в [8].

Статистическая обработка результатов. Для определения эффективности выделения вирусов гриппа от привитых животных или детей применяли тест χ^2 Мак Немара с использованием пакета программ «StatsDirect, Version 2,5,7». Величина уровня статистической значимости была принята 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Контактная передача различных штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo*. При совместном содержании морских свинок, инфицированных вирусами NIBRG-23 (H5N1) или А/Калифорния/7/2009 (H1N1), и неинфицированных животных было отмечено регулярное выделение вируса из носовых смывов у всех животных, как зараженных, так и контактных. Серологическое обследование сывороток, полученных через 4 и 8 нед после инфицирования, показало 100% уровень передачи вируса контактным животным (табл. 1).

При совместном содержании свинок, половина из которых была инфицирована вирусом H1N1, а другая половина – вирусом H5N1, у животных, зараженных вирусом NIBRG-23, отмечено выделение из носовых смывов и легких только этого вируса. У свинок, зараженных пандемическим вирусом, зарегистрировано присутствие обоих вирусов, как самого H1N1, так и H5N1.

Холодоадаптированный донор аттенуации не передавался от одной свинки к другой в тех условиях,

Таблица 1

Результаты выделения вирусов гриппа у морских свинок, содержащихся вместе с зараженными животными

Опыт	Животные заражены вирусом гриппа или получили плацебо			Выделение вируса из смывов		Серологическое подтверждение		Заключение
	Клетка	К-во свинок	Вирус					
№ 1	Клетка	К-во свинок	Вирус	H1N1		H1N1		Передача вируса
	№ 1	7	H1N1 ¹	7/7		7/7		Произошла
		6	Плацебо	5/6		6/6		
№ 2	Клетка	К-во свинок	Вирус	H5N1		H5N1		Передача вируса
	№ 2	15	H5N1 ²	15/15		15/15		Произошла
		15	Плацебо	15/15		15/15		
№ 3	Клетка	К-во свинок	Вирус	H2N2		H2N2		Передача вируса
	№ 3	5	H2N2 ³	5/5		5/5		Не произошла
		3	Плацебо	0/3		0/3		
№ 4	Клетка	К-во свинок	Вирус	H1N1/38		H1N1/38		Передача вируса
	№ 4	8	H1N1/38 ⁴	7/8		8/8		Не произошла
		5	Плацебо	0/5		0/5		
№ 5	Клетка	К-во свинок	Вирус	H1N1	H5N1	H1N1	H5N1	Передача вируса
	№ 5	3	H1N1	3/3	3/3	3/3	3/3	Не произошла
		2	H5N1	0/2	2/2	0/2	2/2	Произошла

Примечание. Здесь и в табл. 2: ¹Пандемический штамм 2009 г. А/Калифорния/7/2009 (H1N1). ²Вирус NIBRG-23 (H5N1) – реассортантный штамм для инактивированной вакцины, содержащий гены NA и NA от высокопатогенного вируса гриппа птиц А/инднок/Турция/1/05 (H5N1) с модифицированным кливедж-сайтом гена гемагглютинина, а гены, кодирующие внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) – от высокоурожайного донора А/PR/8/34 (H1N1). ³Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). ⁴Реассортантный вакцинный штамм пандемической гриппозной вакцины А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1).

Результаты выделения вирусов гриппа у морских свинок, содержащихся на расстоянии 4–5 м от зараженных животных

Опыт	Животные заражены вирусом гриппа или получили плацебо			Выделение вируса из смывов		Серологическое подтверждение		Заключение
	Клетка	К-во свинок	Вирус					
№ 6	Клетка № 6	3	H1N1 ¹	H1N1		H1N1		Передача вируса
	№ 7	3	Плацебо	0/3		0/3		Не произошла
	Клетка № 8	3	H5N1 ²	3/3		3/3		
№ 7	№ 9	4	Плацебо	4/4		4/4		Произошла
	Клетка № 10	4	H2N2 ³	H2N2		H2N2		
	№ 11	4	Плацебо	0/4		0/4		
№ 8	Клетка № 12	10	H2N2	H2N2	H1N1	H2N2	H1N1	Передача вируса
	№ 13	4	H1N1	8/10		0/10		Не произошла
	№ 14	4	H1N1	0/4		3/4		Не произошла
№ 9	Клетка № 15	4	H5N1	H2N2	H5N1	H2N2	H5N1	Передача вируса
	№ 16	9	H2N2	8/9		0/9		Не произошла
	№ 17	4	H5N1	0/4		4/4		Не произошла
№ 10	Клетка № 18	2	H1N1	H1N1	H5N1	H1N1	H5N1	Передача вируса
	№ 19	2	H1N1	2/2		2/2		Не произошла
	№ 20	2	H5N1	0/2		2/2		Произошла

в которых трансмиссивность вируса «дикого» типа (H1N1 или H5N1) составляла 100%. Аналогично, в опытах по инфицированию свинок ХА вакцинным штаммом А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), было показано, что этот реассортант не передавался при непосредственном контакте с неинфицированными животными (табл. 1).

Передача различных штаммов вируса гриппа на расстоянии в экспериментах *in vivo*. В данном разделе работы животных, зараженных исследуемыми штаммами вируса гриппа, и контрольных особей, получивших препарат плацебо, содержали в клетках, расположенных на расстоянии 4–5 м друг от друга. Установлено, что вирус H5N1 регулярно передавался здоровым животным, удаленным от инфицированных особей. Более того, при территориальном разобщении свинок, зараженных вирусами H1N1 и H5N1, у животных, зараженных пандемическим вирусом H1N1, зарегистрировано присутствие гемагглютинина не только H1, но и H5. У свинок, зараженных вирусом H5N1, выделяли только H5N1 вирус (табл. 2).

Изучение возможной передачи штаммов живой гриппозной вакцины (в наблюдениях на детях). 24 ребенка 3–6 лет были привиты однократно коммерческой ЖГВ. Вирус был выделен у 22 детей из 24, что составило 91,7%. Полученные изоляты далее типировались в РТГА с гипериммунными крысинными сыворотками к вирусам А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Вайоминг/3/03 (H3N2) и В/Джиллин/20/03. В табл. 3 приведены результаты выделения и типиро-

вания вакцинных изолятов. Приживляемость штаммов трехвалентной ЖГВ составила 66,7% (16 из 24) для компонентов А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) и В/60/Джиллин/03/1 и 29,2% (7 из 24) для компонента А/17/Вайоминг/03/8 (H3N2).

Таблица 3

Результаты выделения и типирования изолятов от детей 3–6 лет, привитых живой гриппозной вакциной, на 2–4-й дни после вакцинации

Число детей, от которых был выделен вакцинный вирус	Типирование вакцинного вируса		
	H1 ¹	H3 ²	B ³
I. Группа привитых (24 ребенка)			
4 из 24	H1	–	–
1 из 24	–	H3	–
4 из 24	–	–	B
7 из 24	H1	–	B
2 из 24	H1	H3	–
2 из 24	–	H3	B
2 из 24	H1	H3	B
Всего 22 из 24, из них:	16	7	16
II. Группа плацебо (28 детей)			
0 из 28	–	–	–

Примечание. Вирус выделяли в куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK. ¹А/Новая Каледония/20/99 (H1N1). ²А/Вайоминг/3/03 (H3N2). ³В/Джиллин/20/03.

Параллельно с группой детей, привитых трехвалентной ЖГВ, анализировалась равнозначная по числу лиц группа детей (28 человек), получивших

препарат «плацебо» (аллантаоисная жидкость куриного эмбриона). Отбор детей в обе группы проводили таким образом, чтобы в отдельных коллективах находилось примерно равное число представителей каждой группы. Ни у одного из 28 лиц группы плацебо вирус не выделился после трех пассажей в куриных эмбрионах и в культуре MDCK (табл. 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что передачи вакцинных штаммов от привитых контактными лицам не произошло, т. е. живая гриппозная вакцина нетрансмиссивна.

Реассортация донора аттенуации и вируса гриппа H5N1 в экспериментах in vivo. Несмотря на полученное выше подтверждение отсутствия передачи вакцинного вируса контактными детям при высоком уровне выделения вакцинных штаммов в группе вакцинированных лиц, нельзя полностью исключить теоретическую возможность наступления такого события, как одновременное инфицирование одного хозяина холодоадаптированным и циркулирующим «диким» штаммами. Чтобы понять, что может произойти в такой гипотетической ситуации, было смоделировано одномоментное заражение морских свинок высокотрансмиссивным вирусом гриппа NIBRG-23 и донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 с целью последующего анализа состава генома и фенотипических свойств полученных клонов.

Морских свинок заражали интраназально смесью, содержащей вирус NIBRG-23 (H5N1) и донор аттенуации. На 2-й и 3-й дни после заражения производили забор носовых смывов в стерильный физиологический раствор. Затем смывы клонировали в куриных эмбрионах в присутствии антисыворотки к донору аттенуации и без нее. При клонировании смывов без специфической антисыворотки

было получено более 60 клонов, каждый из которых представлял собой родительский донорский вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). И только при использовании такого селектирующего фактора, как антисыворотка к донору аттенуации, позволяющая подавить репродукцию вирусных частиц, содержащих гемагглютинин донора, было получено 6 реассортантов, унаследовавших гемагглютинин вируса NIBRG-23 (H5N1).

Дальнейший анализ состава их генома показал, что все реассортанты содержали NA, PB2, PB1 и NS донора аттенуации, PA ген – от вируса PR8. У двух клонов NP и M ген также принадлежали донору аттенуации, а у четырех других – вирусу PR8 (табл. 4). Анализ фенотипических свойств реассортантных вирусов показал, что все они обладали температурочувствительностью (*ts*-фенотип) и холодоадаптированностью (*ca*-фенотип), присущими донору аттенуации, т. е. не размножались в куриных эмбрионах при температуре выше оптимальной (39 °С) и активно репродуцировались при температуре инкубации, пониженной до 25 °С (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Массовая передача эпидемических и пандемических вирусов гриппа определяется эффективностью, с которой вызвавший заболевание штамм распространяется между людьми. Механизмы, лежащие в основе передачи вируса гриппа, до настоящего времени не были проанализированы до конца. Во многом это обуславливалось отсутствием животных, которые могли бы служить подходящей моделью для изучения феномена трансмиссивности вируса гриппа [11].

Таблица 4

Состав генома и фенотипические свойства реассортантов, выделенных из носовых смывов морских свинок, зараженных одновременно донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вирусом NIBRG-23 (H5N1)

Вирусы	Гены								Соотношение 17 : PR : Tur	Фенотип	
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS			
Родительские вирусы											
Донор ¹	17 ²	17	17	17	17	17	17	17	8 : 0 : 0	<i>ts</i> ³	<i>ca</i> ⁴
NIBRG-23 ⁵	PR ⁶	PR	PR	Tur ⁷	PR	Tur	PR	PR	0 : 6 : 2	<i>non-ts</i>	<i>non-ca</i>
Реассортанты (клоны)											
Клон 1	17	17	PR	Tur	17	17	17	17	6 : 1 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Клон 2	17	17	PR	Tur	17	17	17	17	6 : 1 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Клон 3	17	17	PR	Tur	PR	17	PR	17	4 : 3 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Клон 4	17	17	PR	Tur	PR	17	PR	17	4 : 3 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Клон 5	17	17	PR	Tur	PR	17	PR	17	4 : 3 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>
Клон 6	17	17	PR	Tur	PR	17	PR	17	4 : 3 : 1	<i>ts</i>	<i>ca</i>

Примечание. ¹Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). ²Ген принадлежит донору аттенуации. ³Вирус не способен к репродукции при 39 °С. ⁴Вирус размножается при 25 °С. ⁵Реассортантный штамм для инактивированной вакцины, содержащий гены HA и NA от высокопатогенного вируса гриппа птиц А/индюк/Турция/1/05 (H5N1), а гены PB2, PB1, PA, NP, M и NS – от высокоурожайного донора А/PR/8/34 (H1N1). ⁶Ген принадлежит вирусу А/PR/8/34 (H1N1). ⁷Ген принадлежит высокопатогенному вирусу А/индюк/Турция/1/05 (H5N1) с модифицированным кливд-сайтом гена гемагглютинина.

Несмотря на то, что в 1960-х гг. проводились работы, посвященные попыткам моделирования передачи вируса гриппа в экспериментах на мышах [21–22], по современным представлениям эти животные не пригодны для экспериментов такого рода [11]. Хорьки являются вполне адекватной моделью для изучения патогенеза и трансмиссивности [6, 34], но они дороги в содержании и доступны далеко не всем исследователям [35]. Что же касается морских свинок, то, по последним данным, они оказались великолепной моделью для изучения контагиозности вирусов гриппа типа А, как сезонных, так и пандемических [11, 23].

Регулярно появляющиеся с 1997 г. сообщения о случаях межвидовой передачи птичьего гриппа человеку привлекают особое внимание общественности и специалистов к этой проблеме в связи с возможностью начала новой пандемии птичьего гриппа [31, 35]. Это направление исследований стало представлять еще больший интерес в связи с начавшейся в 2009 г. пандемией «свиного» гриппа. Поэтому в настоящей работе сделана попытка моделирования трансмиссивности штамма H1N1, вызвавшего последнюю пандемию, и вируса NIBRG-23, несущего поверхностные антигены от вируса гриппа птиц H5N1.

Установлено, что эффективность передачи вируса NIBRG-23 была значительно выше, чем вируса А/Калифорния/7/2009. Если для последнего феномен трансмиссивности был отмечен только при совместном содержании инфицированных и неинфицированных животных, то вирус H5N1 регулярно передавался здоровым животным, находящимся на расстоянии 4–5 м от инфицированных особей. Более того, как при совместном содержании, так и при территориальном разобщении свинок, зараженных вирусами H1N1 и H5N1, у животных, зараженных пандемическим вирусом, отмечено выделение из носовых смывов и легких клонов, содержащих не только гены вируса А/Калифорния/7/2009, но и NIBRG-23. В обратном направлении передача вируса не происходила – у животных, зараженных H5N1, даже при непосредственном контакте со свинками, инфицированными H1N1, выделяли только H5N1 вирус.

Можно предположить, что полученные результаты подтверждают высокую потенциальную опасность адаптации вирусов гриппа птиц к организму человека, что неминуемо может привести к массовому распространению этих вирусов в человеческой популяции, а также отражают свойства «калифорнийского» пандемического вируса, который, по мнению многих исследователей [18], не является столь высоко вирулентным для человека, каким был печально знаменитый вирус «испанки» H1N1, вызвавший пандемию 1918 г.

На сегодняшний день наиболее эффективным методом защиты от гриппа является вакцинопрофилактика. Живая гриппозная реассортантная холодоадаптированная вакцина представляет собой трехкомпонентный препарат вакцинных штаммов, применяемый для вакцинации населения с целью защиты от гриппозной инфекции. Основу любой ЖГВ составляют два холодоадаптированных донора аттенуации, на базе которых готовят реассортантные вакцинные штаммы типа А и В. Доноры аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 были получены из вирусов «дикого» типа в результате их серийного пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при пониженной до 25 °С температуре инкубации и в настоящее время используются в качестве доноров «внутренних» генов при подготовке отечественной реассортантной трехвалентной холодоадаптированной ЖГВ [1]. Аналогичные ХА доноры аттенуации – А/Энн Арбор/6/60са (H2N2) и В/Энн Арбор/1/66са – подготовлены для американской ЖГВ FluMist [13–14]. Доноры характеризуются тремя основными свойствами, которые они передают в геном вакцинного штамма: холодоадаптированностью, температурочувствительностью и аттенуацией для человека и лабораторных животных.

Начиная с 1977 г. были опубликованы результаты многочисленных исследований, в которых ни разу не было зарегистрировано передачи вакцинных штаммов живой холодоадаптированной гриппозной вакцины при тесном контакте привитых взрослых и детей и непривитых лиц [5, 19]. Только в одном исследовании описан единичный случай передачи вакцинного вируса от привитого ребенка ребенку, получившему препарат плацебо [28]. При этом никаких клинически выраженных симптомов у него отмечено не было.

В наших наблюдениях за посещавшими детские сады детьми 3–6 лет, привитыми живой гриппозной вакциной и находящимися в тесном контакте с детьми, получившими препарат плацебо, не было отмечено передачи вакцинного вируса непривитым детям при высоком уровне выделения вакцинных штаммов в группе вакцинированных (вакцинные вирусы были изолированы у 22 из 24 человек, что составило 91,7%).

В экспериментах на морских свинках было показано, что аттенуированный вакцинный штамм не передается контактным свинкам [12]. Кроме того, авторы продемонстрировали блокирование передачи «дикого» вируса гриппа сероподтипа H3N2 в результате предварительной вакцинации морских свинок с помощью живой аттенуированной вакцины, подготовленной на основе вируса А/Панама/2007/99 (H3N2). Вакцинация живым вакцинным вирусом приводила к формированию стерильного иммуни-

тета и предотвращала передачу как гомологичного (А/Панама/2007/99), так и гетерологичного (А/Висконсин/67/05), «дикого» вируса H3N2 неиммунным контактным животным.

В результате наших экспериментов было показано, что ХА аттенуированный штамм пандемической вакцины А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) не передавался морским свинкам, находящимся в тесном контакте с вакцинированными животными. ХА донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) также не передавался ни контактным свинкам, ни животным, зараженным «дикими» вирусами H1N1 и H5N1, и наоборот, животные, зараженные «дикими» штаммами вируса гриппа, не инфицировали особей, вакцинированных ХА штаммом. Таким образом, можно считать, что в нашей работе был продемонстрирован факт интерференции ХА штамма с вирусами «дикого» типа.

Следует отметить, что в последние годы интерес к живой гриппозной холодоадаптированной вакцине значительно возрос. Отчасти это связано с тем, что ВОЗ признала преимущества применения ЖГВ по сравнению с инактивированной вакциной в случае наступления пандемической ситуации [30, 33]. Поэтому очень важно ответить на периодически поднимающийся в прессе вопрос о возможности распространения среди населения штаммов живой гриппозной вакцины с их последующей реассортацией с циркулирующими вирусами, что, по мнению авторов публикаций [2, 4], может привести к формированию особо опасных мутантных вирусов.

В литературе описаны случаи появления в циркуляции двойных реассортантных вирусов гриппа человека. Так, было зарегистрировано появление реассортантных вирусов А (H1N2), унаследовавших гемагглютинин от А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)-подобных вирусов, а нейраминидазу – от социркулирующих с ними вирусов серотипа А (H3N2) [10]. Известны случаи реассортации между вирусами гриппа В, принадлежащих Викторианской ветви и линии Ямагата [16, 24]. Однако по своему эпидемическому потенциалу эти штаммы практически не отличались от обычных (не реассортантных) сезонных вирусов. Что же касается одновременной реассортации в свиньях вирусов гриппа человека, свиней и птиц, то это может привести (и приводит) к формированию тройных реассортантных штаммов с пандемическими потенциалами [17, 20]. Не исключено, что именно констелляция генов от трех разных родительских вирусов обуславливает появление высоковирулентных штаммов. Поэтому нужно было показать, что фенотипические свойства тройных реассортантов, полученных на основе ХА донора аттенуации – источника внутренних генов любой ЖГВ,

соответствуют признакам безвредного для человека донора аттенуации, а не «дикого» вируса.

В результате скрещивания в системе *in vivo* (в организме морских свинок) нами были получены тройные реассортанты, содержащие в своем геноме гены от трех разных вирусов (А/Ленинград/134/17/57, А/индюк/Турция/1/05 и А/PR/8/34). Анализ фенотипических свойств этих реассортантов показал, что все они обладали температурочувствительностью (*ts*-фенотип) и холодоадаптированностью (*ca*-фенотип), присущими донору аттенуации, и ни один не унаследовал *non-ts/non-ca* фенотип другого родительского штамма – NIBRG-23 (H5N1), подготовленного на основе высокопатогенного вируса гриппа птиц. Все реассортанты содержали PB2, PB1, NA и NS гены донора аттенуации. Видимо, этим и объясняется *ts/ca*-фенотип полученных реассортантов, поскольку известно, что именно гены PB2 и PB1 определяют аттенуирующие свойства донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [7].

Таким образом, установленная ранее ведущая роль полимеразных генов в формировании *ts/ca*-фенотипа классических двойных реассортантов между донором аттенуации и «диким» вирусом оказалась справедлива и для тройных реассортантов, несущих гемагглютинин вируса гриппа птиц А/индюк/Турция/1/05 (H5N1), нейраминидазу донора аттенуации, и различные комбинации внутренних генов донора и вируса А/PR/8/34 (H1N1).

В работе [15] показано, что включение в состав реассортантов поверхностных антигенов от высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1, а внутренних генов – от сезонных штаммов H3N2 человеческого происхождения резко ограничивает контагиозность таких реассортантов среди хорьков и, таким образом, не приводит к формированию клонов с таким же пандемическим потенциалом, какой имелся у родительского вируса H5N1. Поэтому можно полагать, что даже если произойдет теоретически маловероятная реассортация пандемического или эпидемического вируса с аттенуированным ХА штаммом, это тем более приведет к формированию реассортантов, потерявших вирулентные свойства «дикого» родителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из результатов данного исследования следует, что вирус NIBRG-23 (H5N1) является высоко трансмиссивным вирусом, передающимся не только контактным животным, содержащимся непосредственно в той же самой клетке, но и особям, находящимся от них на значительном расстоянии. По сравнению с ним новый пандемический вирус А/Калифорния/7/2009 (H1N1) не является столь высоко контагиозным для морских свинок.

Установленный факт интерференции ХА штаммов с вирусами «дикого» типа открывает новые перспективы применения живой гриппозной аттенуированной вакцины в пандемической ситуации и подтверждает необоснованность опасений о формировании при массовой вакцинации населения живой вакциной мутантных «вирусов-убийц» с повышенным уровнем патогенности.

Работа была выполнена при поддержке международного гранта «PATH's Influenza Vaccine Project. Vaccine Development Global Program»

Литература

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб.: Наука, 1994.
2. Батенева Т. 22 миллиона россиян вооружат против гриппа – 2006 // Электронный портал «Известия науки» от 22.09.2006. <http://www.inauka.ru/health/article67790.html>.
3. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных // Приказ Минздрава РФ №266 (Правила клинической практики в Российской Федерации) от 19.06.2003. 23 с. <http://www.soramn.ru/3/prikaz2003.pdf>.
4. Чего больше от вакцинации – пользы или вреда? // Электронное периодическое издание «РИАН.Ру» от 13.10.2006. <http://www.rian.ru/society/20061013/54786587.html>.
5. Davenport F.M., Hennessy A.V., Maassab H.F. et al. Pilot studies on recombinant cold-adapted live type A and B influenza virus vaccines // *J. Infect. Dis.* 1977. Vol. 136. № 1. P. 17–25.
6. Herlocher M.L., Elias S., Truscon R. et al. Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus // *J. Infect. Dis.* 2001. Vol. 184. № 5. P. 542–546.
7. Kiseleva I., Klimov A., Su Q. et al. Role of individual genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) cold-adapted donor strain in manifestation of the temperature sensitive phenotype of reassortant influenza A viruses // Y. Kawaoka (ed.), Proceedings of “Options for the Control of Influenza V”. Okinawa, Japan, 7–11 October, 2003. Amsterdam: Elsevier. 2004. P. 547–550.
8. Kiseleva I., Voeten J.T.M., Teley L.C.P. et al. PB2 and PA genes control the expression of the temperature sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus // *J. Gen. Virol.* 2010. Vol. 91. P. 931–937.
9. Klimov A.I., Cox N.J. PCR restriction analysis of genome composition and stability of cold-adapted reassortant live influenza vaccines // *J. Virol. Methods.* 1995. Vol. 52. P. 41–49.
10. Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses // *Virus Res.* 2004. Vol. 103. № 1–2. P. 47–52.
11. Lowen A.C., Mubareka S., Tumpey T.M. et al. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. № 26. P. 9988–9992.
12. Lowen A.C., Steel J., Mubareka S. et al. Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model // *J. Virol.* 2009. Vol. 83. № 7. P. 2803–2818.
13. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristic of influenza virus at 25 degrees C // *Nature.* 1967. Vol. 213. P. 612–614.
14. Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines // *Vaccine.* 1985. Vol. 3. № 5. P. 355–369.
15. Maines T.R., Chen L.M., Matsuoka Y. et al. Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. № 32. P. 12121–12126.
16. McCullers J.A., Wang G.C., He S., Webster R.G. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature // *J. Virol.* 1999. Vol. 73. № 9. P. 7343–7348.
17. Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus // *Nature.* 2009. Vol. 459. № 7249. P. 931–939.
18. Padlan E.A. The pandemic 2009 (H1N1) swine influenza virus is mild compared to the pandemic 1918 (H1N1) virus because of a proline-to-serine substitution in the receptor-binding site of its hemagglutinin – a hypothesis // *Med. Hypotheses.* 2010. Vol. 74. № 2. P. 240–241.
19. Rudenko L.G., Lonskaya N.I., Klimov A.I. et al. Clinical and epidemiological evaluation of a live, cold-adapted influenza vaccine for 3–14-year-olds // *Bull. World Health Organ.* 1996. Vol. 74. № 1. P. 77–84.
20. Russell M.L., Keenlside J., Webby R. et al. Protocol: transmission and prevention of influenza in Hutterites: zoonotic transmission of influenza A: swine & swine workers // *BMC Public Health.* 2009. Vol. 9. № 420. P. 1–6.
21. Schulman J.L. The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection // *Am. J. Public Health.* 1968. Vol. 58. P. 2092–2096.
22. Schulman J.L., Kilbourne E.D. Airborne transmission of influenza virus infection in mice // *Nature.* 1962. Vol. 195. P. 1129–1130.
23. Steel J., Staeheli P., Mubareka S. et al. Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment // *J. Virol.* 2010. Vol. 84. № 1. P. 21–26.
24. Tsai H.P., Wang H.C., Kiang D. et al. Increasing appearance of reassortant influenza B virus in Taiwan from 2002 to 2005 // *J. Clin. Microbiol.* 2006. Vol. 44. № 8. P. 2705–2713.
25. Thompson W.W., Moore M.R., Weintraub E. et al. Estimating influenza-associated deaths in the United States // *Am. J. Public Health.* 2009. Suppl. 2. P. S225–S230.

26. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E. et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States // JAMA. 2003. Vol. 289. № 2. P. 179–186.
27. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F. et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1) // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. № 4. P. 333–340.
28. Vesikari T., Karvonen A., Korhonen T. et al. A randomized, double-blind study of the safety, transmissibility and phenotypic and genotypic stability of cold-adapted influenza virus vaccine // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006. Vol. 25. № 7. P. 590–595.
29. Wang H., Feng Z., Shu Y. et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China // *Lancet*. 2008. Vol. 371. № 9622. P. 1427–1434.
30. WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007 // http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html
31. WHO. Global alert and response (GAR). Confirmed Human Cases of Avian Influenza A (H5N1) // http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/
32. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Edition of 2002. <http://www.wpro.who.int/internet/resources.ashx/CSR/Publications/manual+on+animal+ai+diagnosis+and+surveillance.pdf>
33. WHO. Progress in pandemic influenza vaccine preparedness (24 February 2009) // http://www.who.int/immunization/newsroom/medianote_progress_Pandemic_influenza_feb09/en/index.html
34. Yen H.L., Lipatov A.S., Ilyushina N.A. et al. Inefficient transmission of H5N1 influenza viruses in a ferret contact model // *Virology*. 2007. Vol. 81. № 13. P. 6890–6898.
35. Zitzow L.A., Rowe T., Morken T. et al. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets // *J. Virology*. 2002. Vol. 76. № 9. P. 4420–4429.