

## Contents

**Открывая науку: какие возможности дает Open Access?..... ii-iv**

Мария Дебабова

**Discovering science: what opportunities does Open Access give? ..... v-vii**

Maria Debabova

**Influenza vaccines manufacturing in continuous cell lines: problems and solutions.....1-9**

Julia Romanova

**Применение микрочипов для идентификации происхождения генов вирусов гриппа  
диких птиц ..... 10-20**

Р. Н. Гейдаров, Н. Ф. Ломакина, Е. Ю. Боравлева, И.С. Холодилов, А. С. Гамбарян,  
В. М. Михайлович, Е. Е. Фесенко

**The use of microarrays for the identification of the origin of genes of avian influenza viruses  
in wild birds ..... 21-30**

Rustam N. Heydarov, Natalia F. Lomakina, Elizaveta Yu. Boravleva, Ivan S. Kholodilov,  
Alexandra S. Gambaryan, Vladimir M. Mikhailovich, Eugene E. Fesenko

**Fighting bacterial resistance: approaches, challenges, and opportunities in the search for new  
antibiotics. Part 1. Antibiotics used in clinical practice: mechanisms of action and the development  
of bacterial resistance ..... 31-51**

Alexander Zhivich

**Effect of triazavirine on the outcome of a lethal influenza infection and secondary bacterial  
pneumonia following influenza in mice ..... 52-57**

Irina A. Leneva, Irina N. Falynskova, Nailya R. Makhmudova, Ekaterina A. Glubokova,  
Nadezhda P. Karnasheva, Eugenia I. Leonova, Natalya A. Mikhailova, Irina V. Shestakova

МАТЕРИАЛ ОТ РЕДАКЦИИ

## Открывая науку: какие возможности дает Open Access?

**Мария Дебабова**

Журналист, основательница научно-популярного YouTube-канала Ratiomania

DOI: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-II-IV

Понятие «открытый доступ» (Open Access) впервые появилось в медиа-пространстве 16 лет назад. Основные положения этой концепции были сформулированы в рамках Будапештской инициативы [1], ставшей ответом научного сообщества на ужесточающиеся условия получения и распространения информации и, как следствие, – невозможности эффективной международной коммуникации ученых.

Все эти годы открытый доступ – популярный и обсуждаемый тренд в научной и околонаучной среде, постоянный предмет дискуссий ученых, журналистов, популяризаторов науки, преподавателей, библиотекарей, издателей, финансовых специалистов, госслужащих и просто интересующихся наукой людей.

### Что такое открытый доступ?

Согласно общепринятой концепции [2], открытый доступ предоставляет любому человеку возможность использовать и распространять научные или учебные материалы в сети Интернет без лицензионных или иных ограничений (например, обязательной регистрации на сайте), бесплатно, быстро и в полнотекстовом режиме.

Открытый доступ предусматривает также указание типа открытой лицензии, свободное индексирование текстов поисковыми роботами и получение их пользователями в виде распознаваемых машинами данных.

На сегодняшний день существует два основных пути размещения научных работ в открытом доступе: депонирование и публикации в журналах открытого доступа.

### Борьба за доступность научных данных

Проблема доступа к научным статьям остро стоит во многих странах, включая Российскую Федерацию. Политика крупных игроков рынка – издательств и так называемых «элитных» научных ресурсов – такова, что ученым приходится платить десятки долларов за каждую статью, которую они хотят прочесть.

Руководитель проекта «КиберЛенинка», директор ассоциации «Открытая наука» Дмитрий Семячкин в интервью portalу «Индикатор» (Indicator.Ru) [3] отмечает: «Конечно, крупные издательства не заинтересованы в открытом доступе. Это большой бизнес и большие деньги. Что касается компании Elsevier, то она входит в 500 крупнейших компаний мира, находясь в верхней половине таблицы. Для сравнения: по

капитализации компания превосходит Сбербанк России. Маржинальность этого бизнеса огромна, она выше, чем у многих мировых технологических компаний».

Нехватка средств у ученых на подписку создает информационный вакуум и лишает их возможности полноценной работы, как это, например, произошло в 2015 году в России, когда по решению издательства Springer нашим НИИ и вузам за неуплату был отключен доступ к тысячам научных журналов [4].

Одним из радикальных решений проблемы доступа к научным материалам стал проект Sci-Hub, который в 2011 году создала Александра Элбакян.

Принцип работы ресурса заключается в том, что добровольцы, пользуясь учетными записями ВУЗов или покупая одну учетную запись у издательства, активно скачивают статьи и передают в базу Sci-Hub, где те хранятся и открываются по поисковым запросам пользователей без ограничения, что соответствует принципам Open Access.

Вот какую статистику приводит Sci-Hub за 2017 год: «Итоги 2017 года на Sci-Hub: около 150 миллионов загрузок научных статей – это по 400 000 статей ежедневно. По количеству запросов ожидается лидирует Китай – с 25 миллионами, за ним следует Индия – с 13 миллионами скачиваний. Также в десятку попадают США – 12 миллионов скачиваний, Бразилия – 7 миллионов, Иран – 6 с половиной, неожиданно Индонезия – с 5 миллионами и Россия с Францией – по 4 миллиона каждая. По 3 миллиона скачиваний у Мексики и у неизвестной страны – то есть когда скрипт Sci-Hub не смог установить местоположение» [5].

Оценили эффект Sci-Hub и крупные издательства: на Александре как авторе проекта висит огромный штраф в 15 миллионов долларов в их пользу [6].

### Инициативы по продвижению открытого доступа в РФ

Один из крупнейших общественных проектов, призванный помочь продвижению открытого доступа в России, – это «КиберЛенинка», которая входит в ассоциацию «Открытая наука» [7].

В отличие от Sci-Hub «КиберЛенинка» размещает только те материалы, которые изначально находятся в открытом доступе. На момент написания этой статьи 1538 академических научных журналов перешли в режим Open Access и используют «КиберЛенинку» как площадку для публикации материалов [8].

В интервью порталу «Индикатор» руководитель проекта Дмитрий Семячкин отметил, что всеобщий открытый доступ к научным результатам позволит (правительству в том числе) значительно повысить качество оценки эффективности науки.

В том же интервью было замечено, что пока открытый доступ – относительно дорогое удовольствие для ученых. Когда исследователь публикует статью, он или его организация платит за это журналам открытого доступа. Однако развитие таких проектов ведет к снижению стоимости публикации [3].

### **Преимущества публикации научных статей в открытом доступе**

*Почему авторам выгодно размещать научные статьи в режиме Open Access?*

1. Повышение цитируемости. За время существования концепции Open Access был проведен ряд исследований, показавших, что публикация в открытом доступе повышает цитируемость статьи примерно в 2,5-5,8 раза [9].
2. Публикация актуальных исследований в максимально короткие сроки. В отличие от подписных научных печатных изданий, где статья может пролежать до года, журналы открытого доступа предоставляют возможность быстрой публикации в сети Интернет, что, в свою очередь, дает возможность подтвердить первенство в получении результатов [10].
3. Привлечение внимания общественности к своим работам. Ученым важно делиться результатами своих исследований не только с научным сообществом, но и с широкой общественностью, привлекая СМИ и популяризаторов науки к освещению своих тем. Открытый доступ дает возможность ознакомиться со статьей всем заинтересованным лицам.

### **Мнение популяризатора науки**

*Иван Бутов, молекулярный биолог, популяризатор науки, основатель научно-популярного YouTube-канала «Sciantik»:*

«Проблема открытости научных данных существует давно, и ее нельзя недооценивать. Рассмотрим конкретный пример. Предположим, вы аспирант, который ищет статьи по своей научной работе, и находите 20, у которых вы прочитали аннотацию, и вам они показались интересными и полезными. Пускай половина находится в открытом доступе, а на остальные вы, а точнее ваш институт, у которого нет подписки, тратит определенную немалую сумму. В результате реально полезными для вас оказываются 8 открытых и 2 купленных материала, а остальные, в лучшем случае, можно использовать в качестве ссылок при написании статей и диссертации. Большая часть потраченных денег уходит в никуда. А те, кто

работает или учится в маленьких институтах в бедных странах, в принципе не могут себе позволить купить нужные статьи. Единственная их возможность прочесть необходимые материалы – это использование «пиратских» ресурсов.

Если же говорить о популяризаторах науки или людях, которые хотят углубиться в какой-то вопрос, связанный с наукой, то у них практически нет возможности это сделать бесплатно и легально. Есть мнение, что можно воспользоваться библиотеками, но действительно ли это так? Возьмём, к примеру, Российскую государственную библиотеку, крупнейшую в стране. У нее есть подписки практически на все научные ресурсы, есть электронный доступ к ним. Могу ли я как популяризатор или просто интересующийся человек воспользоваться этим доступом? Если у меня есть читательский билет, время и возможности для посещения самой библиотеки, то да. В ином случае возникают проблемы – только к 24 из более чем 130 электронных ресурсов библиотека предоставляет полностью свободный доступ [11]. На некоторые из них можно зайти с домашнего ПК при наличии читательского билета, а в основном – только с компьютеров библиотеки.

С моей точки зрения, научные статьи являются мировым достоянием, и они должны находиться в открытом доступе, помогая развиваться человечеству, а не только отдельным странам или коммерческим структурам».

### **Выводы**

Публикации в режиме Open Access – это лишь первый шаг для открытия науки в современных условиях возможных ограничений иного доступа (например, к сети Интернет), но шаг необходимый.

Открытый доступ к статьям даёт широкие возможности для образования, борьбы с обскурантизмом и, прежде всего, для международной экспертизы научных работ, что позволяет ученым России и других стран стать участниками глобального рынка исследований.

Сегодня наука – уникальный язык коммуникации, мост между учеными, СМИ, студентами и преподавателями, сильными мира сего и обывателями. Президент РАН, академик Александр Сергеев в интервью «Интерфаксу» [12] отметил, что «отношения между учеными [...] возможно, остаются последним связующим звеном в межгосударственных отношениях». Интеграция в мировую науку и налаживание международных научных контактов – в том числе для усиления позиций государства – невозможны без свободного доступа к публикациям коллег из разных стран. Именно поэтому так важны лояльность и поддержка концепции открытого доступа на самых разных уровнях: от участников научного сообщества до благотворительных фондов, коммерческих структур, представителей государственной власти и всех лиц, заинтересованных в развитии науки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Budapest Open Access Initiative. <http://www.budapestopenaccessinitiative.org>.
2. Suber, Peter. Open Access Overview. <http://legacy.earlham.edu/~peters/fos/overview.htm>.
3. «Маржинальность этого бизнеса огромна»: с руководителем КиберЛенинки о будущем научных публикаций. <http://indicator.ru/article/2017/02/15/kiberleninka-semyachkin-interview>.
4. Российских ученых лишили подписки на иностранные научные журналы. <http://www.forbes.ru/news/288213-rossiiskikh-uchenykh-lishili-podpiski-na-inostrannye-nauchnye-zhurnaly>.
5. Пост об итогах 2017 года в ВК-сообществе Sci-Hub. [http://vk.com/sci\\_hub?w=wall-36928352\\_20202](http://vk.com/sci_hub?w=wall-36928352_20202).
6. Sci-Hub грозит ещё один штраф \$4,6 млн и блокировка. <http://geektimes.ru/post/292719/>.
7. Открытая наука. <http://open-science.ru>.
8. КиберЛенинка. Научные журналы. <http://cyberleninka.ru/journal>.
9. «Зачем ученому открытая наука?». [http://www.chaskor.ru/article/zachem\\_uchenomu\\_otkrytaya\\_nauka\\_41190](http://www.chaskor.ru/article/zachem_uchenomu_otkrytaya_nauka_41190)
10. Признание модели журналов открытого доступа как способ повышения качества научных публикаций в России. <http://cyberleninka.ru/article/n/priznanie-modeli-zhurnalov-otkrytogo-dostupa-kak-sposob-povysheniya-kachestva-nauchnyh-publikatsiy-v-rossii>.
11. Электронные ресурсы РГБ / Удаленные сетевые ресурсы. <http://olden.rsl.ru/ru/networkresources>.
12. Научная дипломатия или технологическое противоборство? – <http://www.interfax.ru/russia/594072>.

## EDITORIAL

# Discovering science: what opportunities does Open Access give?

**Maria Debabova**

Journalist, founder of the popular science YouTube channel “Ratiomania”

DOI: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-V-VII

The concept of Open Access first appeared in the media 16 years ago. The main source of this concept was formulated within the framework of the Budapest Initiative [1] that became the response of the scientific community to the toughening conditions for obtaining and distributing information and, as a consequence, the impossibility for scientists to conduct effective international communication.

Over the course of these years, Open Access has been a popular trend in the scientific environment, a constant subject of discussions among scientists, journalists, science popularizers, teachers, librarians, publishers, financial specialists, civil servants, and those in the general public who are interested in science.

### What is Open Access?

According to the generally accepted concept [2], Open Access allows anyone to use and distribute scientific or educational materials on the Internet without licensing or other restrictions (for example, mandatory registration on a website), for free, quickly, and in full text mode.

All of the data that is distributed on the Open Access platform should also contain an indication of the type of open license, support free indexing by search robots, and ensure the delivery of texts to users in the form of machine recognized data.

To date, there are two main ways to put scientific papers in the public domain: deposition and publication in Open Access journals.

### The struggle for the availability of scientific data

The problem of access to scientific articles is a hot issue in many countries, including the Russian Federation. The policy of the major market players – publishers and so-called «elite» scientific resources – is such that scientists have to pay tens of dollars for every article that they want to read.

Dmitry Semyachkin, the head of the CyberLeninka project, the director of the Open Science Association, in an interview with the Indicator.ru portal [3] notes: «Of course, large publishers are not interested in Open Access. It is a big business and big money. As for Elsevier, it is among the 500 largest companies in the world, being in the upper half of the table. For comparison: the company's market capitalization exceeds that of Sberbank of Russia. Marginality of this business is huge; it is higher than that of many world technology companies.»

The lack of funds for scientists to subscribe to expensive scientific databases creates an information vacuum

and deprives them of the proper way to conduct research as, for example, it happened in 2015 in Russia, when, by the decision of the Springer publishing house, our research institutes and universities, which failed to pay the fee, were denied access to thousands of scientific journals [4].

One of the most radical solutions to the problem of access to scientific materials was the project Sci-Hub, which was started by Alexandra Elbakyan in 2011.

The principle of that resource is that volunteers, using the accounts of universities or buying one account from the publisher, actively download the articles and transfer them to the Sci-Hub database, where they are stored and are available for search and download to users without restriction, which complies with the principles of Open Access.

Here are the statistics of the Sci-Hub for 2017: «The results of 2017 on Sci-Hub: about 150 million downloads of scientific articles, which means 400,000 articles daily. According to the number of requests, as expected the leading country is China with 25 million, followed by India with 13 million downloads. In addition, in the group of the top ten countries are the US (12 million downloads), Brazil (7 million), Iran (6.5 million), unexpectedly Indonesia with 5 million, and Russia and France (4 million each). There were 3 million downloads made from Mexico and from some other unknown country (the script Sci-Hub could not establish its location)» [5].

Of course, the Sci-Hub project was condemned by the large publishers: they fined Alexandra \$15 million as a manager of this project [6].

### Initiatives to promote Open Access in the Russian Federation

One of the largest public projects, designed to assist the promotion of Open Access in Russia, is CyberLeninka, which is a part of the Open Science association [7].

Unlike the Sci-Hub, CyberLeninka has on its website only those materials that are initially in the public domain. At present, 1,538 academic scientific journals have changed their publishing model to Open Access and are using CyberLeninka as a platform for the distribution of their materials on the Internet [8].

In an interview with the Indicator portal, the project manager Dmitry Semyachkin emphasized that the universal Open Access of scientific results will allow the authorities (including the government) to significantly improve the quality of the evaluation of the effectiveness of science.

In the same interview, it was noted that Open Access is relatively expensive for scientists currently. When a researcher publishes an article, he/she or the research organization that he/she works for, pays the fee to Open Access journals. However, the development of such projects leads to a reduction of the publication cost [3].

### Advantages of publishing scientific articles in the public domain

*Why is it advantageous for the authors to publish scientific articles in Open Access mode?*

1. Increased citation. A number of studies carried out during the existence of the Open Access concept showed that publication in Open Access increases the article's citation approx. 2.5-5.8 times [9].
2. Publishing research results of current importance in the shortest possible time. Unlike the subscription of scientific journals, where the publication of an article can be held up for a long time – up to a year, Open Access journals provide the opportunity for rapid publication on the Internet, which in turn makes it possible to confirm the precedence in obtaining results [10].
3. Attracting public attention to their work. It is important for scientists to share the results of their research not only with the scientific community, but also with the general public, attracting the media and popularizers of science to cover the topics of their research. Open Access makes it possible for all of the interested parties to read and distribute scientific information.

### Opinion of a popularizer of science

*Ivan Butov, molecular biologist, popularizer of science, founder of the popular YouTube channel “Sciantik”:*

“The problem with the openness of scientific data has existed for a long time, and it cannot be underestimated. Let's consider an example. Suppose you are a graduate student looking for scientific articles on a corresponding topic, and you find 20 papers that seem to be interesting and useful to you after you have read the abstracts. Let's say half of these papers are in the public domain and, in order to get the rest of the publications, you, or rather your institution, which does not have a subscription, will have to spend a significant amount of money. As a result, 8 Open Access and 2 purchased papers are really useful to you, and the rest, at best, could be used as references when writing articles and a thesis. Most of the spent money goes nowhere. Those graduate students who work or study in small institutions in poor countries, in principle, cannot afford to buy the necessary articles. The only way they can read the necessary materials is to use “pirated” resources.

Talking about the popularizers of science or people who want to delve into the study of some issue related to science, they practically do not have the opportunity to do it for free and legally. There is an opinion that you can use libraries, but is that really so? Take, for example,

the Russian State Library, the largest in the country. This library has subscriptions to almost all scientific resources, including electronic access to them. Can I use this resource as a promoter or simply as an interested person? If I have a library card, time, and the opportunity to visit the library, then the answer is ‘yes’. Otherwise, I will face problems: the library provides completely free access to only 24 of the more than 130 electronic resources [11]. Some of them can be accessed from a home PC if you have a library card, but most of them – only from the library's computers.

From my point of view, scientific articles are world heritage, and they should be publicly available in order to help the development of all humankind, not just certain countries or commercial organizations”.

### Conclusion

Publications in Open Access mode are only the first but necessary step in order to make scientific publications widely available in modern conditions with possible limitations of access to scientific information.

Open Access to articles provides ample opportunities for education, combating obscurantism and, above all, for the international expertise of scientific papers, which allows Russian and foreign scientists to become participants in the global research market.

Today, science is a unique language of communication, a bridge between scientists, the media, students and teachers, powerful people, and the masses. President of the Russian Academy of Sciences, academician Alexander Sergeev in an interview with Interfax [12] noted: “the relations between scientists [...] may remain the last link in relations between countries”. Integration into the world of science and the establishment of international scientific contacts, which include as one of the goals the strengthening of the position of the state, are impossible without free access to publications of colleagues from different countries. That is why loyalty and support of the concept of Open Access at various levels are so important: from the participants of the scientific community to charitable foundations, commercial structures, state government representatives and everyone who is interested in the further development of science.

### CITATION

M. Debabova. Discovering science: what opportunities does Open Access give? *MIR J*, 2017; 4(1), v-vii, doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-V-VII

### COPYRIGHT

© 2017 Debabova. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC-BY-NC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided the original author and source are cited.

## REFERENCES

1. Budapest Open Access Initiative. Available at: <http://www.budapestopenaccessinitiative.org>.
2. Suber, Peter. Open Access Overview. Available at: <http://legacy.earlham.edu/~peters/fos/overview.htm>.
3. «Marginality of this business is huge». Interview with the head of CyberLeninka project Dmitry Semyachkin. Available at: <http://indicator.ru/article/2017/02/15/kiberleninka-semyachkin-interview>.
4. Russian scientists were denied the subscription for the foreign scientific journals. Available at: <http://www.forbes.ru/news/288213-rossiiskikh-uchenykh-lishili-podpiski-na-inostrannye-nauchnye-zhurnaly>.
5. Post about the results of the year 2017. Available at: [http://vk.com/sci\\_hub?w=wall-36928352\\_20202](http://vk.com/sci_hub?w=wall-36928352_20202).
6. Sci-Hub will be fined another \$ 4.6 million and the website will be blocked. Available at: <http://geek-times.ru/post/292719/>.
7. Open science. Available at: <http://open-science.ru>.
8. CyberLeninka. Scientific journals. Available at: <http://cyberleninka.ru/journal>.
9. Do scientists need open science? Available at: [http://www.chaskor.ru/article/zachem\\_uchenomu\\_otkrytaya\\_nauka\\_41190](http://www.chaskor.ru/article/zachem_uchenomu_otkrytaya_nauka_41190)
10. Recognition of the open access publishing model for scientific journals as the way to enhance the quality of scientific publications in Russia. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/priznanie-modeli-zhurnalov-otkrytogo-dostupa-kak-sposob-povysheniya-kachestva-nauchnyh-publikatsiy-v-rossii>.
11. The digital resources of RGB / The remote network resources. Available at: <http://olden.rsl.ru/ru/networkresources>.
12. Scientific diplomacy or technological war? Available at: <http://www.interfax.ru/russia/594072>.

## REVIEW

# Influenza vaccines manufacturing in continuous cell lines: problems and solutions

Julia Romanova<sup>#</sup>

EURRUS Biotech GmbH, Tulln, Austria

<sup>#</sup> Corresponding author: Julia Romanova, e-mail: jr.romanova@gmail.com**Keywords:** influenza virus, hemagglutinin, vaccine, cell lines, stability, fusion**DOI:** 10.18527/2500-2236-2017-4-1-1-9

Received March 10, 2017

Accepted March 22, 2017

Published March 31, 2017

## ABSTRACT

In order to decrease the morbidity and mortality caused by seasonal influenza outbreaks, several hundred million vaccine doses are produced worldwide each year. The predominant substrate for the production of the influenza vaccine today is fertilized hen's eggs. The substitution of the technology based on living organisms by the cell culture-based process offers many advantages, including easier scalability and reduced dependence on the availability of eggs. The African green monkey kidney and Madin Darby canine kidney cell lines support the efficient growth of influenza viruses of different subtypes and, therefore, are considered to be the two most promising alternative substrates for the production of the human influenza vaccine.

However, the pH of endosomes in both of these cell lines is higher than the pH essential for triggering a conformational change of the hemagglutinin (HA) of human influenza viruses, which enables the viral-cellular membrane fusion. This mismatch gives rise to mutations in the HA that lead to an increase of the optimum pH of HA conformational change. As a result of these mismatches, the HA, and consequently the whole virus, has reduced stability to low pH and elevated temperatures. The production of a vaccine from less stable virus will lead to an elevated HA content in the low pH conformation that can affect the safety, potency, infectivity, and protective efficacy of the final inactivated and live attenuated influenza vaccines.

The main limitations of the cell line-based influenza vaccine technology and the possibilities to preserve the viral stability over the course of influenza vaccine production are discussed in the review.

## INTRODUCTION

According to data from the World Health Organization (WHO), seasonal influenza epidemics cause 250,000 to 500,000 deaths worldwide every year. Vaccination remains the primary measure to prevent the spread of this virus and to reduce the morbidity and mortality caused by influenza disease.

The influenza virus belongs to the family *Orthomyxoviridae* that comprises five genera: influenza A, B, C, *Thogotovirus*, and *Isavirus*. Influenza A and B viruses are the only types that infect humans. The host antibodies are generated to the influenza virus surface glycoproteins: hemagglutinin (HA or H) and neuraminidase (NA or N). These proteins are responsible for the virus attachment to the target cells and subsequent release of new virus particles. To date, 18 variants of HAs and 11 variants of NAs are known for the influenza A virus. The combination of different HAs and NAs in virus defines the influenza A virus subtype. Only the viruses of three subtypes, *i.e.* A(H1N1), A(H2N2), and A(H3N2), have been circulating in the human population that have caused outbreaks and pandemics. There are no known subtypes for the influenza B virus strains, although two antigenically different lineages have been identified, B/Victoria and B/Yamagata.

The WHO performs permanent surveillance and control of new influenza viruses based on the data provided by the National Influenza Centers. The National Centers isolate the viruses from infected humans and characterize them in terms of their antigenic properties and the HA and NA primary structure. The isolation is performed in fertilized hen's eggs or in Madin Darby canine kidney (MDCK) cell line. Two times per year, the WHO selects the most dominating strains and recommends them for the vaccine composition for Northern and Southern hemisphere, respectively (<http://www.who.int/influenza/en/>). The vaccine composition includes two strains of influenza A (H3N2 and H1N1) and one strain of B virus for the production of trivalent preparation. The high growth seed viruses of influenza A are generated by the genetic reassortment of the H1N1 and H3N2 viruses provided by the WHO Collaborative Centers with egg-adapted virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8). Influenza B strains are used without any reassortment. All seed viruses are then distributed to the manufacturers. It is important to notice that only egg-isolated virus strains are allowed for use in the vaccine production because of the established safety parameters for this substrate.



Reports about the sporadic infections of humans with low pathogenic (H9N2, H7N2, H7N3) and highly pathogenic (H5N1, H7N3, H7N7, and H7N9) avian influenza viruses (LPAIVs and HPAIVs, respectively) are constantly being published [1-4]. The wild aquatic birds are the main source of LPAIVs. These viruses replicate predominantly in the intestinal tract of birds and induce asymptomatic infection [5]. Sporadically, LPAIVs infect domestic animals and poultry, and can infect humans working on the animal and poultry farms causing the symptomatic disease. The disease induced by HPAIVs is more severe. These viruses infect wild birds as well as poultry and induce infection with a mortality rate close to 100%. The reassortment of any avian virus with a human strain can result in the emergence of the virus with new antigenic proteins. Such a virus would have pandemic potential since the human population lacks immunity to the avian HA and NA proteins and, consequently, a pre-pandemic vaccine should be produced in this case.

The vast majority (approx. 500 million doses) of all the existing vaccines are produced in hen's eggs – an old production system developed in the 1950s [6]. The production of the influenza vaccine in eggs is a cumbersome and time-consuming process. The duration of the whole process is about 6 months. The eggs for vaccine manufacture must be free of any pathogens (specific pathogen free, SPF) and should be ordered in advance to insure the continuous process. The estimated current capacity of all vaccine producing companies is 1.42 billion doses per year, which is not enough to supply the world's population in the case of a pandemic threat [6]. Substitution of the egg-based vaccine production technology by the process based on continuous cell lines offers many advantages including easier scalability and reduced dependence on eggs availability. Several cell lines, such as Vero, MDCK, human embryonic retinal (PER.C6), and human embryonic kidney (HEK293) cells, are considered as candidates for vaccine production. The Vero and MDCK are the two most developed to date cell lines recommended by the WHO as safe substrates for the production of human influenza vaccine. Vero cell line is widely used for the production of Inactivated Polio Vaccine (IPV), rotavirus (RotaTeq and Rotarix) and smallpox (ACAM2000) vaccines. Baxter International Inc. developed the technology for the production of influenza vaccine in Vero cells grown on Cytodex microcarriers. Trivalent Vero-derived influenza vaccine against seasonal influenza, Preflucel, was licensed in European Union (EU) in 2010. The pandemic vaccine Celvapan® against H1N1pdm09 virus and pre-pandemic vaccine Vepacel against H5N1 virus were also licensed in EU [7]. However, in 2011, 300,000 doses of Preflucel vaccine were withdrawn from the market because of a high percentage of side effects noticed after the vaccination. Sanofi Pasteur had undertaken an attempt to develop the production of the inactivated influenza vaccine in PER.C6 cells, but this project was discontinued. First influenza MDCK-derived vaccine Influvac was licensed in the Netherlands by Solvay Biologicals as a split virus preparation produced in cells cultivated in Cytodex

microcarriers [8]. Nevertheless, after the acquisition of the Solvay Biologicals by Abbott, the production of Influvac vaccine was discontinued. The attempts undertaken by MedImmune and Nabilon to develop the production of the two live attenuated influenza (LAI) vaccines in MDCK cells were also stopped. The only one MDCK-derived vaccine approved in EU [9] and the US today is Optaflu/Flucelvax (Novartis) – the trivalent subunit vaccine against seasonal influenza. In addition, Protein Sciences [10] licensed in the US the first recombinant trivalent influenza vaccine FluBlok produced in insect *expresSF* cells using a baculovirus expression system. The main limitations of the cell line-based technology for influenza vaccine production are discussed in this review.

### Differences between human and avian influenza viruses

The binding affinity of virus HA protein to the cells of different species is one of the parameters that defines the species barrier for influenza viruses. The influenza viruses initiate the infection via attachment to the ciliated epithelial cells in the upper respiratory tract (URT). The HAs of human influenza viruses recognize and bind to oligosaccharide chains terminated with the sialic acid- $\alpha$ 2,6-galactose (SA $\alpha$ 2,6Gal), which are prevalent on the human upper respiratory tract epithelial cells [11]. The avian influenza viruses bind to the SA $\alpha$ 2,3Gal-terminated glycans that dominate on the surface of avian epithelial tissues [12]. Cells expressing the SA $\alpha$ 2,3Gal-saccharides are known to be present in human bronchial epithelium and dominate in human lungs. Therefore, the avian influenza viruses can induce the disease in humans if the virus reaches lungs of the exposed person, for example, upon the close contact with infected bird.

One of the innate mechanisms of defense in mammals is the acidification of the mucosal surfaces of the nasal passageways in response to irritation or inflammation. The degree of acidification of these surfaces in mammals varies depending on the distribution and activity of the submucosal glands. The pH of the human passageway has a range from 5.2 to 8.0 [13-18]. Therefore, the efficient infection of human URT cells requires a certain level of virus stability to acidic pH. The acidic pH triggers the HA irreversible conformational change to the low pH form. This HA structural change happens in the endosome upon acidification and enables the fusion of the endosomal and viral membranes in order to release the viral genome to the cell cytoplasm. The pH threshold necessary for the HA conformational change is called the pH of fusion. The HAs of human and LPAIVs are known to change the conformation at the pH range from 5.1 to 5.4 [19, 20]. The HAs of HPAIVs are characterized by an elevated pH of fusion (from 5.6 to 6.0) [20] and, therefore, these viruses are much less stable to the acidic pH than LPAIVs and seasonal influenza viruses [21].

The essential prerequisite for influenza virus replication is the HA cleavage to HA1 and HA2 subunits by cell proteases that is necessary for release the fusion peptide. The HA of the human and LPAI viruses contains

a single arginine (-R-) cleavage site that is cleaved by the trypsin-like serine proteases present in the human airways [22]. The HAs of HPAIVs contain the polybasic cleavage site (e.g. R-S-S-R or R-S-R-R) that is cleaved by intracellular furin-like serine proteases expressed in different tissues [23]. This feature enables virus spreading to different organs and the induction of systemic infection. Therefore, the HPAIVs are highly virulent for humans and cause influenza disease with a mortality rate exceeding 50%. All of these differences between human and avian influenza viruses have to be taken into account when developing the vaccine production technology.

### Virus adaptation passages and their consequences

As it was already mentioned, the primary influenza viruses are isolated in the fertilized hen's eggs. The cells of the amniotic and chorioallantoic membranes of the egg are the main target cells for influenza virus replication. These cells express both types of sialylated glycans, but predominantly with SA $\alpha$ 2,3Gal linkage. The shortage of the human-like receptors in eggs is the first barrier for the effective replication of some human influenza isolates. Thus, the insufficient growth of virus A/Fujian/411/2002 (H3N2) induced the delayed vaccine production in the season of 2003-2004 [24]. For the same reason in 2008, it was necessary to substitute the poorly growing virus A/Brisbane/10/2007 (H3N2) by the A/Uruguay/716/2007 (H3N2) virus. In order to overcome this limitation, the primary isolates are usually subjected to several consecutive passages in eggs. The other approach is to perform the reassortment process with PR8 virus in the primary chicken embryo kidney cells instead of eggs. Both ways are associated with the emergence of the adaptation mutations in the HA protein that can change the receptor-binding and antigenic properties, or change the pH of HA fusion [25-27].

Earlier, we investigated the emergence of HA mutations upon the isolation of human influenza viruses from clinical material in eggs, as well as in the MDCK and Vero cell lines [28]. We found that the isolation of influenza A viruses in eggs was always accompanied by HA mutations. The amino acid substitutions found for the H1N1 viruses (225Asp→Gly, 226Gln→Arg) or for the H3N2 viruses (194Leu→Ile, 220Arg→Ser) were located near the HA receptor-binding site (RBS), and were associated with its specificity [29]. One (220Arg→Ser) or two (133Asn→Asp, 218Gly→Glu) substitutions located near the HA RBS were found in H3N2 viruses isolated in the MDCK cells as opposed to the Vero cells. These mutations were associated with the glycosylation pattern of the MDCK cells [28]. The sequence of the HA1 subunit of H1N1 viruses isolated in both Vero and MDCK cells was identical to that of the human virus present in swab. However, mutations in the HA2 fusion peptide were often identified for H1N1 viruses (unpublished data).

The Vero and MDCK continuous cell lines are known to have an equal amount of cells containing the saccharides with both types of sialic acid linkages (SA $\alpha$ 2,3Gal as well as SA $\alpha$ 2,6Gal) on the surface [30]. Most of the human influenza primary isolates easily grow

in MDCK cells, while their growth in Vero cells is less efficient. The authors of several publications have shown [25, 31] that the adaptation of influenza viruses to the growth in MDCK and Vero cell lines induces mutations that increase the pH of fusion of the influenza virus HA. According to the experimental data, the endosomal pH in MDCK cells is around 6.4 and reaches even higher values in Vero cells [31, 32]. The endosomal pH in the chicken embryo fibroblasts (CEF) is around 6.4, however, there is no data available on the endosomal pH of the cells in the chorioallantoic or amniotic membranes [32]. All the above mentioned data lead to the conclusion that the relatively high endosomal pH might explain the selection of mutants with an increased pH of HA fusion post adaptation to the growth in MDCK and Vero cell lines.

Thus, none of the studied substrates are ideal for the cultivation of human influenza viruses. In order to assess the consequences of virus adaptation to various substrates, we performed 5 consecutive passages of H1N1, H3N2, and influenza B viruses in eggs as well as in the MDCK and Vero cell lines and compared the properties of obtained viruses [33]. The egg-derived seed viruses recommended for the vaccine production were selected as the starting material. Previously, we demonstrated [34] that HA mutations that increase the pH of HA fusion lead to decreased stability of the virus to the low pH and elevated temperatures. These vaccine candidates showed the decreased immunogenicity upon the intranasal immunization of ferrets. Therefore, the pH of HA fusion and virus stability were the main parameters assessed in this study.

According to the obtained data, no mutations were revealed after 5 passages of influenza B strain in any of these substrates. Five passages of A/Brisbane/59/2007 (H1N1) and A/Brisbane/10/2007 (H3N2) viruses in eggs also did not induce any changes in HA. On the other hand, 5 passages of A/Brisbane/59/2007 (H1N1) in Vero cells, as opposed to the MDCK cells, led to mutations that increased the pH of HA fusion by 0.4 units. This change was associated with HA1 mutation 190Asn→Val and HA2 stalk mutation 50Asn→Lys. The resultant virus became more sensitive to the acidic pH and elevated temperatures. The passages of A/Brisbane/10/2007 (H3N2) virus in both MDCK and Vero cells induced the enhancement of the pH of HA fusion by 0.1 unit (HA2 mutation 160Asp→Glu) that was associated with decreased stability to acidic pH and elevated temperatures. It is necessary to mention that the pH of HA fusion of initial egg-derived virus A/Brisbane/10/2007 was 6.0. This value is 0.4 units higher than that known for the human influenza viruses and particularly for the antigenically similar human isolate A/Nizhny Novgorod/ 668/08. One can assume that the enhancement of pH of fusion of A/Brisbane/10/2007 virus HA happened upon the adaptation passages in eggs. Additional passages of this virus in both cell lines led to a further increase of the pH of HA fusion and to a decrease in its stability. For all of the obtained mutants, the increased pH threshold of HA conformational change was associated with reduced virus stability to acidic pH and elevated temperatures.

Furthermore, we showed that the concentrated purified preparation made from the less stable virus mutant contained about 50% less HA than the analogous preparation from the more stable virus according to the single radial immunodiffusion (SRID) assay. This assay measures the amount of HA molecules present in the vaccine in the native conformation [35].

The obtained data show that the passages of human influenza viruses in eggs as well as in the MDCK and Vero cell lines induce mutations that increase the pH of HA fusion, which in turn impair the virus stability toward low pH and elevated temperatures. The mutations related to this change were identified in various HA regions, including the receptor-binding domain [36], interface between the HA1 and HA2 subunits [37-39], the coiled-coil regions of the HA2 subunit [37, 40, 41], and the fusion peptide pocket [40, 42]. However, it seems that passages in eggs impair the virus stability less dramatically than the analogous passages in both cell lines. The effect of mutations decreasing virus stability on the quality of influenza vaccines is discussed below.

### **Effect of the influenza virus stability on the quality of inactivated vaccines**

The inactivated influenza vaccines are available as a whole virion, split or subunit preparations that include 3 components (15 µg of each) and are designed for intramuscular or subcutaneous administration. The efficiency of the inactivated influenza vaccine is determined by the amount of antibodies induced to the native HA trimeric structure, which is measured by the hemagglutination inhibition assay (HAI).

The HA of influenza virus with increased pH of fusion is converted to the low pH form much easier. This conformational change is irreversible and happens not only at acidic pH, but also at elevated temperatures or upon exposure to the denaturing reagents [43]. Depending on the vaccine type, the downstream production process might include a number of steps, such as virus inactivation, concentration by ultracentrifugation, purification by chromatography, precipitation, sucrose-gradient centrifugation, chemical disruption, and sterile filtration. All of these steps can trigger the conversion of less stable HA to the low pH form. The HA in the low pH form expresses the hydrophobic domains, which are prone to form aggregates. The presence of viral aggregates in the vaccine can induce the severe adverse effects. Thus, the emergence of the new oculo-respiratory syndrome was detected in 2000-2001 season in adults after immunization with the vaccine that contained a high amount of aggregated unsplit virus particles [44, 45]. Viruses that contain the structurally modified HAs are known to become more sensitive to the cleavage with proteolytic enzymes [46]. In addition, the low pH form of HA expresses the epitopes that are hidden in the native HA conformation. These epitopes induce cross-reactive antibodies with less neutralizing potential [47, 48].

Similar problems were observed in the course of production of the pre-pandemic vaccines from the H5N1 HPAIVs. The inactivated vaccines produced from these

viruses by conventional methods were found to have decreased HA content and immunogenicity compared to the vaccines against seasonal influenza viruses produced by the same methods [49, 50]. The antibodies induced post immunization poorly reacted in the HAI test [51]. In order to reach the protective level of antibodies post immunization with the H5N1 vaccine it was necessary to increase the vaccine dose up to 45-90 µg or to add the adjuvant. At the same time, in some studies the better heterosubtypic cross-protection was observed after immunization with H5N1 vaccines [52].

We hypothesized that the high pH of HA fusion known for the HA of HPAIVs is the main factor affecting the properties of vaccines produced from these viruses. In order to prove that, we introduced the mutation 58Lys→Ile, which is known to decrease the pH of HA fusion, in the HA2 subunit of A/Kurgan/05/2005 (H5N1) virus [53]. Two similar 6/2 reassortants, one containing the original HA and the other with the mutant HA, in combination with NA gene from A/Kurgan/05/2005 and all the other genes from the PR8 virus were constructed. The reassortant with the mutant HA was characterized by a decreased pH of HA fusion by 0.3 units [54] and increased stability toward an acidic pH and elevated temperatures compared to the reassortant with the original HA protein. Two inactivated whole virion vaccine preparations were produced using these reassortants and their properties were compared. We have shown that vaccine preparation from the virus with the mutant HA was more stable to freezing-thawing stress and more resistant to trypsin digestion. The HA content measured by the SRID test for this vaccine preparation was higher than that for the vaccine made from the virus with the original HA.

Therefore, the production of the seasonal and pre-pandemic inactivated influenza vaccines from viruses with reduced stability could lead to decreased vaccine quality.

### **Effect of influenza virus stability on the quality of live attenuated vaccines**

Two LAI vaccines are approved for human use. The first vaccine is licensed in the US and Europe (FluMist®, MedImmune, USA) [55], while the second vaccine is licensed in Russia [56]. Both vaccines contain the cold adapted (CA) attenuated vaccine strains (6/2 reassortants) produced in eggs and are designed for intranasal application. It is known that the immunogenicity of a live vaccine correlates with the productive replication of the vaccine strains in the URT of humans [57].

The analysis of the clinical data shows that the immune response induced by both licensed vaccines is inconsistent. Thus, the pre-pandemic vaccine produced from the virus of H2N2 subtype (FluMist®) showed the restricted virus replication in the URT (24%) and immune response in only 24% of participants [58]. The vaccine strain used in this study was the master strain A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) that is used as a backbone for the seasonal vaccine strains. At the same time, the Russian pre-pandemic vaccine of H2N2 subtype, which contains the reassortant of the master strain

A/Leningrad/134/17/1957 CA with the A/California/1/1966 (H2N2) virus, showed a high replication rate in the URT of volunteers (78.6%) and a high number of responders (92.6%) [57]. The analysis of the origin of both vaccine strains revealed that the virus A/Ann Arbor/6/1960 CA was isolated and attenuated by serial passages in the primary chicken kidney cells and had decreased stability to the acidic pH compared to the original wild type strain [59]. The virus strain used in the Russian vaccine preparation was obtained by classical reassortment in eggs. The surface antigens of this vaccine strain were inherited from the epidemic egg-derived isolate A/California/1/1966 (H2N2) [60]. Based on our results discussed herein above, we can assume that the decreased stability of A/Ann Arbor/6/1960 CA virus is one of the reasons leading to its restricted immunogenicity.

Another reason for the low immunogenicity of the vaccine strains of the LAI vaccine could be the incompatibility of the HA and M genes originated from different strains. O'Donnell *et al.* [61] showed that 6/2 reassortants of A/Ann Arbor/6/1960 CA (H2N2) master strain with viruses of H1N1, H3N2, H2N2, H6N1, H7N3, H9N2, and H5N1 subtypes have an elevated pH of HA fusion and decreased stability to low pH and elevated temperatures compared to the corresponding epidemic viruses. Clinical trials performed with some of 6/2 reassortants showed their restricted replication in the respiratory tract of seronegative adult volunteers [58, 62, 63]. The authors of these papers have found that the decreased stability of the studied reassortants is connected with the nature of the M gene of A/Ann Arbor/6/1960 CA master strain, but the exact mechanism of this phenomenon was not discussed.

One of the proteins coded by M gene is the M2 that is known to have the ion channel activity. It was shown that the M2 protein plays a major role in the preservation of the HA native conformation, preventing the premature HA conformational change to the low pH form during the virus transport to the cell surface [64]. Earlier we demonstrated [65] that the M2 protein of the virus A/Singapore/1/1957 CA (H2N2) has lower ion channel activity than the M2 of A/Switzerland/5389/1995 (H1N1). The 6/2 and 5/3 reassortants that contain the HA and NA or HA, NA and M genes, respectively, from the A/Switzerland/5389/1995(H1N1) virus and all the other genes from the A/Singapore/1/1957 CA were constructed. The intranasal immunization of mice with these reassortants showed the clear difference in the amount of antibodies directed to the HA1 and HA2 subunits. Therefore, the 6/2 reassortant induced 1.7 times more antibodies to the HA2 subunit than to HA1. At the same time, the HA2/HA1 ratio of antibodies induced by 5/3 reassortant was almost similar to that induced by A/Switzerland/5389/1995 virus (1.1 and 1.0, respectively). These results indicate that the M2 protein of A/Singapore/1/1957 CA, which has low ion channel activity, did not prevent the premature conformational change of the A/Switzerland/5389/1995 HA protein to the low pH form during transport to the cell membrane. A similar mechanism can contribute to the premature

conformational change of HA in 6/2 reassortants produced from the A/Ann Arbor/6/1960 CA (H2N2) strain and consequently cause their decreased stability.

The attempts to vaccinate humans with pre-pandemic H5 live influenza vaccines gave the contradictory results. The vaccine strains containing the surface antigens of HPAIVs A/Vietnam/1203/2004 or A/Hong Kong/213/2003 of H5N1 subtype produced using the A/Ann Arbor/6/1960 CA strain (MedImmune) failed to replicate in the human nasal mucosa and to induce a reasonable immune response [66]. At the same time, the vaccine strain containing the HA of the LPAIV A/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2) and all other genes from the A/Leningrad/134/17/1957CA virus replicated efficiently in the URT of humans (up to 10 days) and caused the reasonable systemic and local immune response [67]. This contradiction could be explained by the different HA stability of the corresponding reassortants depending from which virus (HPAIVs or LPAIV) the HA gene was inherited.

In order to prove this hypothesis we introduced the mutation 58Lys→Ile, which is known to decrease the pH of HA fusion, in the HA2 of HPAIV A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Then two analogous 6/2 reassortant vaccine candidates – one with the mutant and the other with the original HA gene – were constructed based on PR8 virus. The attenuation of these viruses was provided by deletion of the NS1 mRNA open reading frame [21]. We have demonstrated that the virus with mutant HA was characterized by a decreased pH of HA fusion and enhanced stability toward low pH and elevated temperatures compared to the analogous virus with original HA sequence. Both viruses were used for the intranasal immunization of mice. The immunization with a more stable virus resulted in increased virus replication in the nasal mucosa, trachea, and lungs of mice as well as induced enhanced humoral and local immunity compared to the virus bearing the original HA.

Therefore, the HA stability of the LAI vaccine reassortants to the low pH and elevated temperatures is crucial for their effective replication in the URT of mammals that consequently could affect the vaccine efficacy.

## CONCLUSION

The cultivation of the human influenza viruses in continuous cell lines such as MDCK and VERO often leads to the emergence of HA mutations that increase the pH of HA fusion and dramatically decrease the stability of HA protein, and consequently the whole virus, to different physical and chemical factors. These viruses are much more sensitive to the procedures of vaccine manufacturing. As a result, the vaccine virions contain a bigger portion of HA proteins in the low pH form, which can affect the safety, potency, infectivity, and protective efficacy of the final inactivated and live attenuated influenza vaccines.

We found a set of conditions that should be met in order to keep the optimal quality of vaccines produced in the cell lines. First, it is necessary to maintain the

HA sequence in the vaccine strain as close as possible to that of the original human virus isolate. In order to accomplish this, the HA and NA genes primary structure of the virus recommended for vaccine composition should be determined before any isolation passages. The construction of vaccine reassortants by reverse genetics methods allows for the cloning of the HA sequence identical to that of the virus present in the human swab, and for the rescue of the virus without any adaptation mutations. The next important goal is to prevent the emergence of HA mutations associated with increased pH of HA fusion during the vaccine production. We have demonstrated that the propagation of viruses at acidified conditions in Vero cell line helps to preserve the original HA primary structure and the virus stability [33]. Another possibility to prevent the emergence of adaptation mutations that increase the pH of HA fusion is to cultivate the virus in the presence of Amphotericin B promoting fusion of viral and cellular membranes [68]. Moreover, the new cell lines that support the effective replication of the human influenza viruses and have low endosomal pH are promising candidates for influenza vaccine production. Cultured mouse heart cells could be considered as an example, since they have more acidic endosomes (pH 5.5) than cultured mouse kidney cells (pH 6.0) [69].

In conclusion, all attempts to develop and produce new cell culture-based influenza vaccines, without taking into account HA mutations leading to an increase of the pH of HA conformational change, are doomed to failure.

## REFERENCES

1. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 1999; 354(9182), 916-7. doi: 10.1016/S0140-6736(99)03311-5.
2. Eames KT, Webb C, Thomas K, Smith J, Salmon R, Temple JM. Assessing the role of contact tracing in a suspected H7N2 influenza A outbreak in humans in Wales. *BMC Infect Dis*. 2010; 10, 141. doi: 10.1186/1471-2334-10-141.
3. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(5), 1356-61. doi: 10.1073/pnas.0308352100.
4. Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(12), 2196-9. doi: 10.3201/eid1012.040961.
5. Kuiken T. Is low pathogenic avian influenza virus virulent for wild waterbirds? *Proc Biol Sci*. 2013; 280(1763), 20130990. doi: 10.1098/rspb.2013.0990.
6. Partridge J, Kieny MP, World Health Organization HNIvTF. Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccines in 2009-2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. *Vaccine*. 2010; 28(30), 4709-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.083.
7. Ehrlich HJ, Muller M, Oh HM, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med*. 2008; 358(24), 2573-84. doi: 10.1056/NEJMoa073121.
8. Palache AM, Brands R, van Scharrenburg GJ. Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs. *J Infect Dis*. 1997; 176 Suppl 1: S20-3. doi: 10.1086/514169.
9. Doroshenko A, Halperin SA. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8(6), 679-88. doi: 10.1586/erv.09.31.
10. Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, Izikson R, Goldenthal KL, Cox MM. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok(R) trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine*. 2011; 29(12), 2272-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.039.

It is obviously that more research in both academia and industry is necessary to develop the new cell-based technologies for the influenza vaccine production.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author has no support or funding to report.

## CONFLICT OF INTERESTS

The author has no relationship with any organizations with financial conflicts and/or financial interests in the subjects disclosed in this paper. No help was used for the preparation of this manuscript.

## CITATION

Romanova J. Influenza vaccines manufacturing in continuous cell lines: problems and solutions. *MIR J*, 2017; 4(1), 1-9. doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-1-9.

## COPYRIGHT

© 2017 Romanova. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC-BY-NC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided the original author and source are credited.

11. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol.* 2007; 171(4),1215-23. doi: 10.2353/ajpath.2007.070248.
12. Sriwilaijaroen N, Wilairat P, Hiramatsu H, Takahashi T, Suzuki T, Ito M, et al. Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virol J.* 2009; 6, 124. doi: 10.1186/1743-422X-6-124.
13. England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1999; 24(1), 67-8. doi: 10.1046/j.1365-2273.1999.00223.x.
14. Washington N, Steele RJ, Jackson SJ, Bush D, Mason J, Gill DA, et al. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *Int J Pharm.* 2000; 198(2), 139-46. doi: 10.1016/S0378-5173(99)00442-1.
15. Hehar SS, Mason JD, Stephen AB, Washington N, Jones NS, Jackson SJ, et al. Twenty-four hour ambulatory nasal pH monitoring. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1999; 24(1), 24-5. doi: 10.1046/j.1365-2273.1999.00190.x.
16. McShane D, Davies JC, Davies MG, Bush A, Geddes DM, Alton EW. Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2003; 21(1), 37-42. doi: 10.1183/09031936.03.00027603.
17. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol.* 2006; 211(3), 139-50. doi:10.1007/s00232-006-0861-0.
18. Wine JJ, Joo NS. Submucosal glands and airway defense. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1(1), 47-53. doi: 10.1513/pats.2306015.
19. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69, 531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
20. Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine.* 1985; 3(3 Suppl), 215-8. doi: 10.1016/0264-410X(85)90109-4.
21. Krenn BM, Egorov A, Romanovskaya-Romanko E, Wolschek M, Nakowitsch S, Ruthsatz T, et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS ONE.* 2011; 6(4), e18577. doi: 10.1371/journal.pone.0018577.
22. Garten W, Braden C, Arendt A, Peitsch C, Baron J, Lu Y, et al. Influenza virus activating host proteases: Identification, localization and inhibitors as potential therapeutics. *Eur J Cell Biol.* 2015; 94(7-9), 375-83. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.05.013.
23. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol.* 1994; 68(9), 6074-8. PubMed PMID: 8057485; PubMed Central PMCID: PMCPMC237016.
24. Lu B, Zhou H, Ye D, Kemble G, Jin H. Improvement of influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics. *J Virol.* 2005; 79(11), 6763-71. doi: 10.1128/JVI.79.11.6763-6771.2005.
25. Lin YP, Wharton SA, Martin J, Skehel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. Adaptation of egg-grown and transfectant influenza viruses for growth in mammalian cells: selection of hemagglutinin mutants with elevated pH of membrane fusion. *Virology.* 1997; 233(2), 402-10. doi: 10.1006/viro.1997.8626.
26. Robertson JS. An overview of host cell selection. *Dev Biol Stand.* 1999; 98, 7-11; discussion 73-4. PubMed PMID: 10494955.
27. Azzi A, Bartolomei-Corsi O, Zakrzewska K, Corcoran T, Newman R, Robertson JS, et al. The haemagglutinins of influenza A (H1N1) viruses in the 'O' or 'D' phases exhibit biological and antigenic differences. *Epidemiol Infect.* 1993; 111(1), 135-42. PubMed PMID: 8348927.
28. Romanova J, Katinger D, Ferko B, Voglauer R, Mochalova L, Bovin N, et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology.* 2003; 307(1), 90-7. doi: 10.1016/S0042-6822(02)00064-8.
29. Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology.* 2003; 313(2), 473-80. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00377-5.
30. Govorkova EA, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster RG. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol.* 1996; 70(8), 5519-24. PubMed PMID: 8764064; PubMed Central PMCID: PMCPMC190510.
31. Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimojima M, et al. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol.* 2012; 86(3), 1405-10. doi: 10.1128/JVI.06009-11.
32. Stray SJ, Air GM. Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis. *Virus Res.* 2001; 77(1), 3-17. doi: 10.1016/S0168-1702(01)00260-X.
33. Nakowitsch S, Waltenberger AM, Wressnigg N, Ferstl N, Triendl A, Kiefmann B, et al. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol J.* 2014; 9(3), 405-14. doi: 10.1002/biot.201300225.

34. Nakowitsch S, Wolschek M, Morokutti A, Ruthsatz T, Krenn BM, Ferko B, et al. Mutations affecting the stability of the haemagglutinin molecule impair the immunogenicity of live attenuated H3N2 intranasal influenza vaccine candidates lacking NS1. *Vaccine*. 2011; 29(19), 3517-24. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.100.
35. Wood JM, Mumford J, Schild GC, Webster RG, Nicholson KG. Single-radial-immunodiffusion potency tests of inactivated influenza vaccines for use in man and animals. *Dev Biol Stand*. 1986; 64, 169-77. PubMed PMID: 3098605.
36. DuBois RM, Zaraket H, Reddivari M, Heath RJ, White SW, Russell CJ. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2011; 7(12), e1002398. doi: 10.1371/journal.ppat.1002398.
37. Reed ML, Yen HL, DuBois RM, Bridges OA, Salomon R, Webster RG, et al. Amino acid residues in the fusion peptide pocket regulate the pH of activation of the H5N1 influenza virus hemagglutinin protein. *J Virol*. 2009; 83(8), 3568-80. doi: 10.1128/JVI.02238-08.
38. Cotter CR, Jin H, Chen Z. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity. *PLoS Pathog*. 2014; 10(1), e1003831. doi: 10.1371/journal.ppat.1003831.
39. Daniels RS, Downie JC, Hay AJ, Knossow M, Skehel JJ, Wang ML, et al. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell*. 1985; 40(2), 431-9. doi: 10.1016/0092-8674(85)90157-6.
40. Steinhauer DA, Martin J, Lin YP, Wharton SA, Oldstone MB, Skehel JJ, et al. Studies using double mutants of the conformational transitions in influenza hemagglutinin required for its membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(23), 12873-8. PubMed PMID: 8917512; PubMed Central PMCID: PMC24013.
41. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 1994; 371(6492), 37-43. Epub 1994/09/01. doi: 10.1038/371037a0.
42. Thoennes S, Li ZN, Lee BJ, Langley WA, Skehel JJ, Russell RJ, et al. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology*. 2008; 370(2), 403-14. doi: 10.1016/j.virol.2007.08.035.
43. Carr CM, Chaudhry C, Kim PS. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(26), 14306-13. PubMed PMID: 9405608; PubMed Central PMCID: PMC24954.
44. Babiuk S, Skowronski DM, De Serres G, HayGlass K, Brunham RC, Babiuk L. Aggregate content influences the Th1/Th2 immune response to influenza vaccine: evidence from a mouse model. *J Med Virol*. 2004; 72(1), 138-42. doi: 10.1002/jmv.10540.
45. De Serres G, Boulianne N, Duval B, Rochette L, Grenier JL, Roussel R, et al. Oculo-respiratory syndrome following influenza vaccination: evidence for occurrence with more than one influenza vaccine. *Vaccine*. 2003; 21(19-20), 2346-53. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00095-1.
46. Amorij JP, Huckriede A, Wilschut J, Frijlink HW, Hinrichs WL. Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm Res*. 2008; 25(6), 1256-73. doi: 10.1007/s11095-008-9559-6.
47. Weldon WC, Wang BZ, Martin MP, Koutsouanos DG, Skountzou I, Compans RW. Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS ONE*. 2010; 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0012466.
48. Quan FS, Li ZN, Kim MC, Yang D, Compans RW, Steinhauer DA, et al. Immunogenicity of low-pH treated whole viral influenza vaccine. *Virology*. 2011; 417(1), 196-202. doi: 10.1016/j.virol.2011.05.014.
49. Bresson JL, Perronne C, Launay O, Gerdil C, Saville M, Wood J, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet*. 2006; 367(9523), 1657-64. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68656-X.
50. Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, Rowe T, Wolff M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N Engl J Med*. 2006; 354(13), 1343-51. doi: 10.1056/NEJMoa055778.
51. Wei CJ, Xu L, Kong WP, Shi W, Canis K, Stevens J, et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J Virol*. 2008; 82(13), 6200-8. doi: 10.1128/JVI.00187-08.
52. Budimir N, de Haan A, Meijerhof T, Gostick E, Price DA, Huckriede A, et al. Heterosubtypic cross-protection induced by whole inactivated influenza virus vaccine in mice: influence of the route of vaccine administration. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013; 7(6), 1202-9. doi: 10.1111/irv.12142.
53. Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC, Hay AJ. Amantadine selection of a mutant influenza virus containing an acid-stable hemagglutinin glycoprotein: evidence for virus-specific regulation of the pH of glycoprotein transport vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(24), 11525-9. doi: 10.1073/pnas.88.24.11525.
54. Sergeeva M, Krokhn A, Matrosovich M, Matrosovich T, Wolschek M, Kiselev O, Romanova J. H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability. *MIR J*. 2014; 1(1), 12-21. doi: 10.18527/2500-2236-2014-1-1-12-26.
55. Ambrose CS, Luke C, Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir Viruses*. 2008; 2(6), 193-202. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x.
56. Rudenko LG, Arden NH, Grigorieva E, Naychin A, Rekestin A, Klimov AI, et al. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated

- influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine*. 2000; 19(2-3), 308-18. PubMed PMID: 10930686.
57. Isakova-Sivak I, Stukova M, Erofeeva M, Naykhin A, Donina S, Petukhova G, et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. *Hum Vaccin Immunother*. 2015; 11(4), 970-82. doi: 10.1080/21645515.2015.1010859.
  58. Talaat KR, Karron RA, Liang PH, McMahon BA, Luke CJ, Thumar B, et al. An open-label phase I trial of a live attenuated H2N2 influenza virus vaccine in healthy adults. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013; 7(1), 66-73. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00350.x.
  59. Maassab HF. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus. *J Immunol*. 1969; 102(3), 728-32. PubMed PMID: 5773321.
  60. Isakova-Sivak I, de Jonge J, Smolonogina T, Rekstin A, van Amerongen G, van Dijken H, et al. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic H2N2 influenza virus. *PLoS One*. 2014; 9(7), e102339. doi: 10.1371/journal.pone.0102339.
  61. O'Donnell CD, Vogel L, Matsuoka Y, Jin H, Subbarao K. The matrix gene segment destabilizes the acid and thermal stability of the hemagglutinin of pandemic live attenuated influenza virus vaccines. *J Virol*. 2014; 88(21), 12374-84. doi: 10.1128/JVI.01107-14.
  62. Talaat KR, Karron RA, Luke CJ, Thumar B, McMahon BA, Chen GL, et al. An open label Phase I trial of a live attenuated H6N1 influenza virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2011; 29(17), 3144-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.043.
  63. Karron RA, Callahan K, Luke C, Thumar B, McAuliffe J, Schappell E, et al. A live attenuated H9N2 influenza vaccine is well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J Infect Dis*. 2009; 199(5), 711-6. doi: 10.1086/596558.
  64. Alvarado-Facundo E, Gao Y, Ribas-Aparicio RM, Jimenez-Alberto A, Weiss CD, Wang W. Influenza virus M2 protein ion channel activity helps to maintain pandemic 2009 H1N1 virus hemagglutinin fusion competence during transport to the cell surface. *J Virol*. 2015; 89(4), 1975-85. doi: 10.1128/JVI.03253-14.
  65. Wolkerstorfer A, Katinger D, Romanova J. Factors affecting the immunogenicity of the live attenuated influenza vaccine produced in continuous cell line. *MIR J*. 2016; 3(1), 13-24. doi: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-13-24.
  66. Karron RA, Talaat K, Luke C, Callahan K, Thumar B, Dilorenzo S, et al. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults. *Vaccine*. 2009; 27(36), 4953-60. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.099.
  67. Rudenko L, Desheva J, Korovkin S, Mironov A, Rekstin A, Grigorieva E, et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials). *Influenza Other Respi Viruses*. 2008; 2(6), 203-9. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00064.x.
  68. Roethl E, Gassner M, Krenn BM, Romanovskaya-Romanko EA, Seper H, Romanova J, et al. Antimycotic-antibiotic amphotericin B promotes influenza virus replication in cell culture. *J Virol*. 2011; 85(21), 11139-45. doi: JVI.00169-11.
  69. Rybak SL, Murphy RF. Primary cell cultures from murine kidney and heart differ in endosomal pH. *J Cell Physiol*. 1998; 176(1), 216-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<216::AID-JCP23>3.0.CO;2-3.



ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

## Применение микрочипов для идентификации происхождения генов вирусов гриппа диких птиц

Р. Н. Гейдаров<sup>1</sup>, Н. Ф. Ломакина<sup>2</sup>, Е. Ю. Боравлева<sup>2</sup>, И.С. Холодилов<sup>2</sup>, А. С. Гамбарян<sup>2#</sup>,  
В. М. Михайлович<sup>1</sup>, Е. Е. Фесенко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт биофизики клетки РАН», Пущино, Российская Федерация

# Для корреспонденции: Александра Гамбарян: al.gambaryan@gmail.com

**Ключевые слова:** вирус гриппа, мониторинг, микрочип

**DOI:** 10.18527/2500-2236-2017-4-1-10-20

Получена 19 октября 2017 г.

Принята к печати 3 ноября 2017 г.

Опубликована 7 декабря 2017 г.

### АННОТАЦИЯ

В черте города Москвы из фекалий диких водоплавающих птиц изолировали 42 штамма вируса гриппа птиц и проанализировали их на микрочипах «Биогрипп», которые содержат 176 зондов к различным участкам генома вирусов гриппа. Микрочип позволяет определять: 1) субтип поверхностных белков гемагглютинаина и нейраминидазы; 2) структуру С-концевой последовательности вирусного белка NS1, влияющую на степень ингибирования транскрипции клеточных хозяйских генов, в том числе ответственных за синтез интерферона; 3) наличие стоп-кодонов и мутацию N66S в рамке считывания вирусного белка PB1-F2, 4) наличие полиосновного сайта протеолитического расщепления гемагглютинаина.

Среди изолятов от диких птиц идентифицированы вирусы гриппа субтипов H3N1, H3N6, H3N8, H4N6, H1N1, H5N3 и H11N9. Все они содержали последовательность ESEV на С-конце белка NS1, полноразмерную рамку считывания для белка PB1-F2. Замена N66S в PB1-F2 обнаружена у шести штаммов. Однако такие маркеры патогенности, как последовательность ESEV (лиганд PDZ-домена) в вирусном белке NS1 и замена N66S PB1-F2 в контексте генома вирусов гриппа диких уток, не делали вирус патогенным для мышей. Все изоляты были высокоурожайны в куриных эмбрионах, инфекционны и иммуногенны для мышей, но не вызывали у этих животных клинических симптомов заболевания.

## The use of microarrays for identification of the origin of genes of avian influenza viruses in wild birds

Rustam N. Heydarov<sup>1</sup>, Natalia F. Lomakina<sup>2</sup>, Elizaveta Yu. Boravleva<sup>2</sup>, Ivan S. Kholodilov<sup>2</sup>,  
Alexandra S. Gambaryan<sup>2#</sup>, Vladimir M. Mikhailovich<sup>1</sup>, Eugene E. Fesenko<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Chumakov Federal scientific center for research and development of immune-and-biological products, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Russian Federation

# Corresponding author: Alexandra Gambaryan: al.gambaryan@gmail.com

**Keywords:** avian influenza virus, monitoring, microarray

### ABSTRACT

Forty-two strains of avian influenza viruses were isolated from the wild waterfowl's feces in the city of Moscow. These viruses as well as reference strains and some experimental reassortants were analyzed by microarrays. The used microarrays contained 176 probes to the different segments of influenza virus genome. The microarray allows to determine 1) the hemagglutinin and neuraminidase proteins subtype; 2) the primary structure of the C-terminal sequence of the viral NS1 protein, which serves as a ligand for the PDZ domain; 3) the presence of stop codons and substitution N66S in the reading frame of the viral protein PB1-F2; 4) the presence of the polybasic site for hemagglutinin cleavage. The viruses of H3N1, H3N6, H3N8, H4N6, H1N1, H5N3 and H11N9 subtypes were identified from the group of wild bird's isolates. All isolates contained the ESEV sequence at the C-terminus of the NS1 protein and the full-length reading frame for the PB1-F2 protein. The replacement of N66S in PB1-F2 was found in six strains. However, the presence of ESEV sequence (ligand of PDZ domain) in the NS1 virus protein and the N66S substitution in PB1-F2 did not lead to the pathogenicity of these viruses for mice. All isolates demonstrated high yield growth in chicken embryos, were infectious and immunogenic for mice, but did not induce any clinical symptoms.

## ВВЕДЕНИЕ

Основным природным резервуаром вирусов гриппа А служат дикие водоплавающие птицы, в первую очередь – утки. Вирус бессимптомно размножается в кишечнике уток и передается преимущественно фекально-оральным путём через воду [1]. Долгая адаптация вируса к своему хозяину приводит к тому, что вирус хорошо размножается в определённых тканях, интенсивно выделяется во внешнюю среду, но хозяин при этом практически не страдает. Такое поведение «выгодно» вирусу, так как активные птицы лучше распространяют инфекцию. Признак высокой патогенности обычно встречается не в природных экосистемах, а там, где постоянный приток объектов заражения обеспечивает искусственным образом. Примером таких систем могут служить птицефермы, где формируются высокопатогенные вирусы птичьего гриппа (high pathogenic avian influenza viruses, HPAIV). Если анализировать эволюционные деревья вирусов, то HPAIV обычно расположены на концах молодых ветвей, поскольку вирус, убивающий хозяина, как следствие, исчезает и сам [2].

Низкопатогенные вирусы гриппа диких птиц (low pathogenic avian influenza viruses, LPAIV) расположены в основаниях эволюционных ветвей всех субтипов вирусов гриппа А. Они эволюционируют медленно и сохраняют ряд характерных признаков. К таким признакам относятся: консервативное строение рецепторсвязывающего участка в верхушечной части гемагглютинаина (HA); строение сайта нарезания, который расщепляется только трипсиноподобными протеазами, секретируемыми в клетках респираторного и желудочно-кишечного тракта, что ограничивает распространение вируса в организме; низкий рН конформационного перехода молекулы HA, обеспечивающий ее высокую устойчивость к кислой среде пищеварительного тракта птиц.

Повышенная патогенность вируса – многофакторная характеристика, которая определяется множественными изменениями в различных генах вируса. Так, в молекуле HA высокопатогенных штаммов присутствует полиосновная последовательность в сайте нарезания [3]. В белке нейраминидазе (NA) появляется делеция в стеблевом участке [4]. Мутация E627K в белке PB2 способствует повышению активности вирусной полимеразы и улучшению репродукции вируса [5–7]. Замена N66S в рамке считывания PB1-F2 ускоряет ядерный транспорт [8–10]. В неструктурном белке NS1 появляются замены, приводящие к эффективному подавлению синтеза интерферона в хозяйской клетке [7, 11–13].

Для мониторинга и экспресс-диагностики вирусов гриппа был разработан микрочип «Биогрипп», который содержит 176 зондов к различным участкам генома вирусов гриппа разных субтипов [14]. Набор реагентов «Биогрипп» позволяет идентифицировать РНК вируса гриппа в биологическом материале и проанализировать типовую и субтипическую

принадлежность вирусов. Этот микрочип также позволяет определить:

- 1) устойчивость к основным противогриппозным лекарственным средствам: препаратам группы адамантанов (амантадин, ремантадин) и ингибиторам NA (озельтамивир и его аналоги);
- 2) наличие и структуру участка связывания PDZ-домена в белке NS1: характерные для HPAIV последовательности ESEV, EPEV, ESKV и KSEV либо характерные для LPAIV – RSKV и RSEV;
- 3) наличие стоп-кодона в позициях 12 и 58 и мутацию N66S в рамке считывания белка PB1-F2;
- 4) наличие в HA подтипов H5 и H7 полиосновного сайта протеолитического расщепления, характерного для HPAIV.

В представленной работе на микрочипах «Биогрипп» проанализировано 42 штамма вируса гриппа А, выделенных от диких водоплавающих птиц в черте города Москвы, 5 референсных штаммов, изолированных от птиц и людей и различающихся по патогенности, а также 5 экспериментальных реассортантов, для которых определяли происхождение генных сегментов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Вирусы

Вирусы из фекалий чаек и уток выделены в 2006–2014 гг. на берегу пруда в Тропаревском парке города Москвы и хранятся в коллекции Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова (Москва, Россия).

Реассортантный вирус VNH5N1-PR8/CDC-RG (VN-PR) (H5N1) сконструирован в Центрах по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) и содержит гены, кодирующие белки HA и NA от вируса A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), а остальные – от штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8). Вирус любезно предоставлен д-ром R. Donis. В гене HA методом обратной генетики модифицирован участок, кодирующий полиосновный сайт нарезания. Холодоадаптированный вирус A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (Len) любезно предоставлен проф. Л. Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия). Вирус A/Hamburg/5/2009 любезно предоставлен д-ром М. Н. Матросовичем (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany), Вирус A/mallard/Sweden/91/2002 (H7N9) любезно предоставлен д-ром R. A. Fouchier (Department of Virology, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands). Вирус A/duck/Buryatia/664/1988 (H3N1) получен из коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи (Москва, Россия). Полные названия и обозначения вирусов приведены в Табл. 1.

Таблица 1. Исследованные вирусы

№	Вирус	Обозначение	Субтип	Номер в GenBank (ген)	PВ1-F2 66 <sup>a</sup>	Линия NS1 <sup>b</sup>
1	A/duck/Buryatia/664/1988	d/664	H3N1	MF969261, MF969262 (HA, NA)	N	A
2	A/duck/Primorie/3628/2002	d/3628	H9N2	DQ787797, DQ787799, DQ787800 (HA, M, NS)	N	A
3	A/mallard/Sweden/91/2002	m/Sw	H7N9		N	A
4	A/gull/Moscow/3100/2006	g/3100	H6N2	EU152234–EU152241	N	A
5	A/duck/Moscow/3554/2008	d/3554	H3N1	GU991376, MF969260 (HA, NA)	N	A
6	A/duck/Moscow/3556/2008	d/3556	H3N1		N	A
7	A/duck/Moscow/3661/2008	d/3661	H4N6	MF680290–MF680297	N	A
8	A/duck/Moscow/3641/2008	d/3641	H11N9	GU991377 (HA)	N	A
9	A/duck/Moscow/3806/2009	d/3806	H3N8	CY120775 (HA)	N	B
10	A/duck/Moscow/3735/2009	d/3735	H4N6	CY120772, MF422091–MF422097	N	B
11	A/duck/Moscow/3740/2009	d/3740	H4N6	CY120773, MF422098–MF422104	N	B
12	A/duck/Moscow/3799/2009	d/3799	H4N6	CY120774, MF422105–MF422111	N	B
13	A/duck/Moscow/3720/2009	d/3720	H6N2	CY120771 (HA)	N	B
14	A/duck/Moscow/4242/2010	d/4242	H3N8		S	A
15	A/duck/Moscow/4298/2010	d/4298	H3N8		N	A
16	A/duck/Moscow/4203/2010	d/4203	H3Nx		N	A
17	A/duck/Moscow/4238/2010	d/4238	H3N6		N	A
18	A/duck/Moscow/4182/2010	d/4182	H5N3	KF885672–KF885679	N	A
19	A/duck/Moscow/4206/2010	d/4206	H5N3		N	A
20	A/duck/Moscow/4031/2010	d/4031	H6N2		S	A
21	A/duck/Moscow/4494/2011	d/4494	H3N8		S	A
22	A/duck/Moscow/4521/2011	d/4521	H3N8		S	A
23	A/duck/Moscow/4522/2011	d/4522	H3N8		S	A
24	A/duck/Moscow/4681/2011	d/4681	H3N8		S	A
25	A/duck/Moscow/4661/2011	d/4661	H3N8		N	A
26	A/duck/Moscow/4518/2011	d/4518	H4N6	MF673524–MF673531	N	A
27	A/duck/Moscow/4528/2011	d/4528	H4N6	MF673532–MF673539	N	A
28	A/duck/Moscow/4641/2011	d/4641	H4N6	MF422112–MF422119	N	A
29	A/duck/Moscow/4652/2011	d/4652	H4N6	KX518711–KX518718	S	A
30	A/duck/Moscow/4643/2011	d/4643	H4N6	KX509943–KX509950	N	A
31	A/duck/Moscow/4524/2011	d/4524	H3N2		N	A
32	A/duck/Moscow/4771/2012	d/4771	H4N6	MF673540–MF673547	N	A
33	A/duck/Moscow/4772/2012	d/4772	H4N6		N	A
34	A/duck/Moscow/4781/2012	d/4781	H4N6	KX530510–KX530517	N	A
35	A/duck/Moscow/4843/2012	d/4843	H4N6	MF673548–MF673555	N	A
36	A/duck/Moscow/4844/2012	d/4844	H4N6		N	A
37	A/duck/Moscow/4788/2012	d/4788	H3N8		N	A
38	A/duck/Moscow/4780/2012	d/4780	H3N8		N	B
39	A/duck/Moscow/4952/2013	d/4952	H5N3		N	A
40	A/duck/Moscow/4971/2013	d/4971	H5N3		N	A
41	A/duck/Moscow/4970/2013	d/4970	H1N1		N	B
42	A/duck/Moscow/5037/2014	d/5037	H3N8		N	A
43	A/Leningrad/134/17/57	Len	H2N2		N	A
44	A/Puerto Rico/8/34	PR8	H1N1		N	A
45	A/Hamburg/5/2009	Hamb	H1N1		N	A
46	A/Vietnam/1203/2004 × A/Puerto Rico/8/34	VN-PR	H5N1		N	A
47	A/chicken/Kurgan/3654at/2005	ch/Ku	H5N1	HQ724520–HQ724527	N	A
Экспериментальные реассортанты						
48	VN-PR × Len (клон 3697)	3697	H5N2		N	A
49	VN-PR × Len (клон 4760)	4760	H5N2		N	A
50	Hamb × Len (клон 4885)	4885	H1N1		N	A
51	Hamb × Len (клон 4886)	4886	H1N1		N	A
52	Hamb × Len (клон 4888)	4888	H1N1		N	A

<sup>a</sup> Аминокислота в позиции 66 белка PВ1-F2.<sup>b</sup> Линия гена NS1 согласно [15].

## Выделение вирусов

Выделение вирусов проводили из свежих фекалий, которые суспендировали в двойном объеме фосфатно-солевого буфера (PBS) с добавлением антибиотиков: 0.4 мг/мл гентамицина, 0.1 мг/мл канамицина, 0.01 мг/мл нистатина и 2% раствора МусоKill АВ (PAA Laboratories GmbH). Суспензию центрифугировали 10 мин при 4 000 об/мин и полученным супернатантом (200 мкл) заражали 10-дневные куриные эмбрионы (КЭ). Аллантаоисную жидкость собирали через 48 ч и для дальнейшего пассирования отбирали пробы, положительные в реакции гемагглютинации (РГА).

## Секвенирование

РНК выделяли сорбционным методом (набор Diatom RNA prep; ООО «Лаборатория Изоген», Россия) или с тризолом (TRI Reagent LS, Sigma) из аллантаоисной жидкости инфицированных КЭ и осветленного 30%-го гомогената, приготовленного из органов на PBS. В реакциях обратной транскрипции с ферментом MMLV (Promega, США) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с Taq-полимеразой использовали универсальные или специфические для вируса гриппа праймеры. Амплифицированные в ПЦР фрагменты разделяли в 0.8–1.5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия, извлекали из агарозного геля и очищали с помощью коммерческих наборов (ООО «Лаборатория Изоген» или Wizard PCR Preps DNA Purification Systems, A7170, Promega). Секвенирование ДНК проводили с использованием набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. При конструировании праймеров и анализе нуклеотидных последовательностей использовали программу Lasergene (DNASTAR, Inc.) и данные NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Номера нуклеотидных последовательностей генов вирусов, зарегистрированных в GenBank, указаны в Табл. 1.

## Анализ на микрочипе

Для анализа использовали кДНК, синтезированную в реакции обратной транскрипции в присутствии вирусной РНК, фермента MMLV и праймера uni12 5'-AGCAAAGCAGG-3'. кДНК вируса амплифицировали методом мультиплексной ПЦР (набор реагентов «Биогрипп») с одновременным введением флуоресцентно меченных оснований, получая в результате одноцепочечные флуоресцентно меченные фрагменты вирусных генов *M2*, *HA*, *NA*, *NS* и *PB1*. Полученную смесь фрагментов генов вируса гриппа гибридизовали на биочипе.

Биочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными микрочайками, содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды. На подложках закреплены пластиковые гибридизационные камеры вместимостью 30 мкл, куда вносят исследуемые флуоресцентно меченные фрагменты генома вирусов гриппа.

При гибридизации флуоресцентно меченный ПЦР-продукт образует комплекс с комплементарным иммобилизованным зондом. Анализ результатов гибридизации проводили с помощью универсального аппаратно-программного комплекса ТУ 9443-004-02699501-2006 (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Россия). Сигнал флуоресценции в каждой ячейке регистрировали камерой с ПЗС-матрицей и подвергали оцифровке.

## Анализ патогенности вирусов для мышей

Мышам линии BALB/c весом 8–12 г вводили интраназально под легким эфирным наркозом по 50 мкл цельной или разведенной вирусосодержащей аллантаоисной жидкости (ВАЖ). Проводили ежедневное наблюдение за состоянием подопытных особей и изменением их веса в сравнении с животными контрольной группы. На 14-е сутки после заражения отбирали кровь для определения уровня антител методом ИФА. Инфекционность вирусов определяли титрованием на КЭ и выражали в lg эмбриональных инфекционных доз (lg ЭИД<sub>50</sub>).

## Получение реассортантов

Для получения холодоадаптированных реассортантов с донором аттенуации Len 10-дневные КЭ заражали одновременно вирусами Len и донором поверхностных белков – по 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub> каждого вируса. КЭ инкубировали 18 ч при 32°C, после чего проводили еще один пассаж длительностью 18 ч при 32°C. Аликвоту полученного вирусного урожая инкубировали в течение ночи с мышинной иммунной сывороткой против вируса Len; затем клонировали методом предельных разведений при 26°C и отбирали пробы, положительные в реакции торможения гемагглютинации с сывороткой против донора поверхностных белков и отрицательные с сывороткой к вирусу Len. После этого трижды клонировали вирус методом предельных разведений, выращивая в течение 96 ч при 26°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В осенние месяцы 2006–2014 гг. на берегу московского пруда в Тропаревском парке собирали фекалии диких водоплавающих птиц и изолировали из них вирусы гриппа. За 9 лет было собрано около 2 000 образцов, из которых выделили 42 штамма вируса гриппа птиц (Табл. 1). Все полученные вирусы характеризовались высокой урожайностью в КЭ и не обладали патогенностью для мышей [16]. Три вируса испытали на цыплятах и также выявили их апатогенность [17]. Геном нескольких вирусов частично или полностью секвенировали [18]. Все выделенные вирусы проанализированы на микрочипе «Биогрипп».

В качестве референсных штаммов использованы вирусы: A/duck/Buryatia/664/1988 (H3N1), A/duck/Primorie/3628/2002 (H9N2), A/mallard/Sweden/91/2002 (H7N9), штамм A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1) [19], аттенуированный в лабораторных условиях, а также циркулировавшие в человеческой популяции

вирусы гриппа подтипов H1N1, H2N2 и H1N1pdm. Основные характеристики и краткие обозначения исследованных вирусов приведены в Табл. 1.

В результате анализа определены субтипы HA и NA всех изолятов. Для вирусов, у которых гены, кодирующие белки HA и NA, были секвенированы ранее, результаты субтипирования на биочипе соответствовали результатам секвенирования.

### Факторы патогенности в природных изолятах

Полиосновной сайт нарезания HA был идентифицирован в HA вируса ch/Ku (H5N1), что соответствует данным секвенирования (GenBank HQ724523.1).

Устойчивость к лекарственным препаратам адмантанового ряда, обусловленная заменами в белке M2, обнаружена только у вирусов гриппа человека: PR8 (A27 и N31) и Hamb (N31).

Во всех изолятах от диких птиц белок NS1 терминирован последовательностью ESEV, а в штаммах ch/Ku, PR8 и Len – последовательностями ESKV, RSEV и RSKV соответственно, что подтверждается данными секвенирования, опубликованными в GenBank.

Стоп-кодон в рамке считывания белка PB1-F2 обнаружен в вирусе Hamb, что также соответствует данным секвенирования. Все природные изоляты содержали полноразмерную рамку считывания белка PB1-F2. У восьми штаммов выявлена замена N66S в белке PB1-F2, которая считается фактором, повышающим патогенность вируса (Табл. 1). Для 15 штаммов, вошедших в исследование, была определена первичная структура гена PB1, и результаты секвенирования подтвердили данные анализа на биочипе.

Для выяснения вопроса, как влияет замена N66S в белке PB1-F2 на патогенность природных изолятов, мы исследовали близкородственные вирусы, отличающиеся по этой позиции, на вирулентность для мышей.

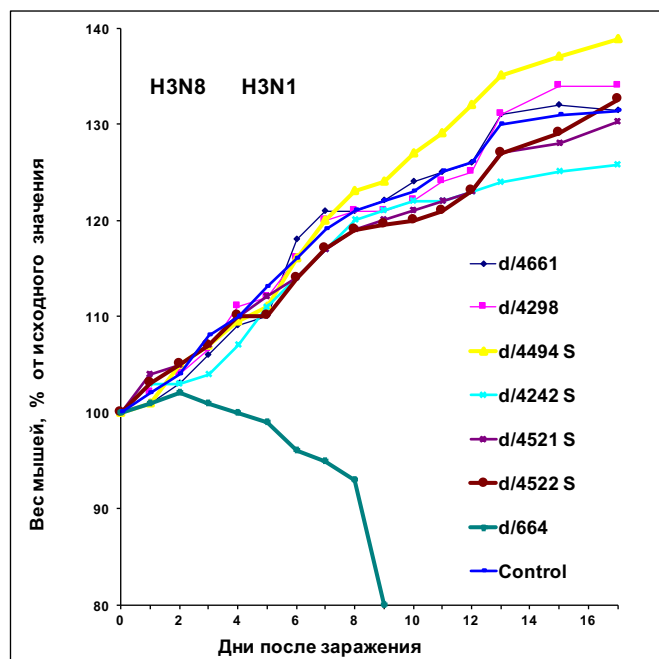


Рис. 1. Динамика изменения веса мышей, инфицированных вирусами d/4661, d/4298, d/4494, d/4242, d/4521, d/4522 и d/664. Вирусы с заменой N66S в PB1-F2 отмечены буквой S.

На Рис.1 приведены данные изменения веса мышей для вирусов гриппа подтипов H3N8 и H3N1. Динамика изменения веса мышей, зараженных утиными вирусами 2008–2014 гг. с N66 и S66 в белке PB1-F2, не отличалась достоверно от динамики контрольных мышей. Аналогичные результаты получены и для вирусов подтипов H4N6 и H6N2 (Табл. 2). Важно подчеркнуть, что у всех зараженных мышей наблюдался мощный вирусспецифический иммунный ответ, проявляющийся в высоких титрах антител (по данным ИФА). Это свидетельствовало о том, что заражение прошло успешно. Единственный утиный штамм вируса гриппа, который вызывал болезнь и гибель мышей, – изолят 1988 года d/664.

Таблица 2. Патогенность и иммуногенность для мышей вирусов гриппа диких птиц, отличающихся по аминокислотной позиции 66 в белке PB1-F2

Вирус	Субтип	А.к. 66 <sup>a</sup>	LD <sub>50</sub> <sup>b</sup>	СГТ <sup>b</sup>
d/4242	H3N8	S	> 6	2523
d/4494	H3N8	S	> 6	3215
d/4521	H3N8	S	> 6	3594
d/4522	H3N8	S	> 6	2163
d/664	H3N1	N	1.8	10000
d/3554	H3N1	N	> 6	1983
d/4298	H3N8	N	> 6	1193
d/4661	H3N8	N	> 6	3519
d/4182	H5N3	N	> 6	1748
d/4206	H5N3	N	> 6	4213
d/4641	H4N6	N	> 6	420
d/4652	H4N6	S	> 6	515
g/3100	H6N2	N	> 6	312
d/3720	H6N2	N	> 6	783
d/4031	H6N2	S	> 6	406

<sup>a</sup> Аминокислота в позиции 66 белка PB1-F2.

<sup>b</sup> Доза вируса, вызывающая гибель 50% мышей, выражена в lg ЭИД<sub>50</sub>.

<sup>b</sup> Среднегеометрический титр (СГТ) антител в мышиных сыворотках (по данным ИФА).

### Определение состава генома лабораторных реассортантов

Благодаря тому, что микрочип «Биогрипп» содержит большое число зондов к каждому из генов разных вирусов гриппа, профили связывания каждого из генов для эволюционно отдаленных вирусов обычно сильно различаются. Например, профили связывания вирусов PR8, Len и Hamb с 14 зондами к гену NS резко отличались как друг от друга, так и от вирусов гриппа птиц (Рис. 2). Различались также профили связывания с 15 зондами к гену M и с 14 зондами к гену PB1-F2. (Рис. 3 и 4). Таким образом, показав, что микрочип «Биогрипп» позволяет дифференцировать генные вариации вирусов, мы применили его для определения происхождения генных сегментов лабораторных реассортантов.

Классический способ получения аттенуированных вакцинных штаммов для живых гриппозных вакцин заключается в реассортации актуального эпидемического вируса с холодоадаптированным донором аттенуации. Реассортация достигается при

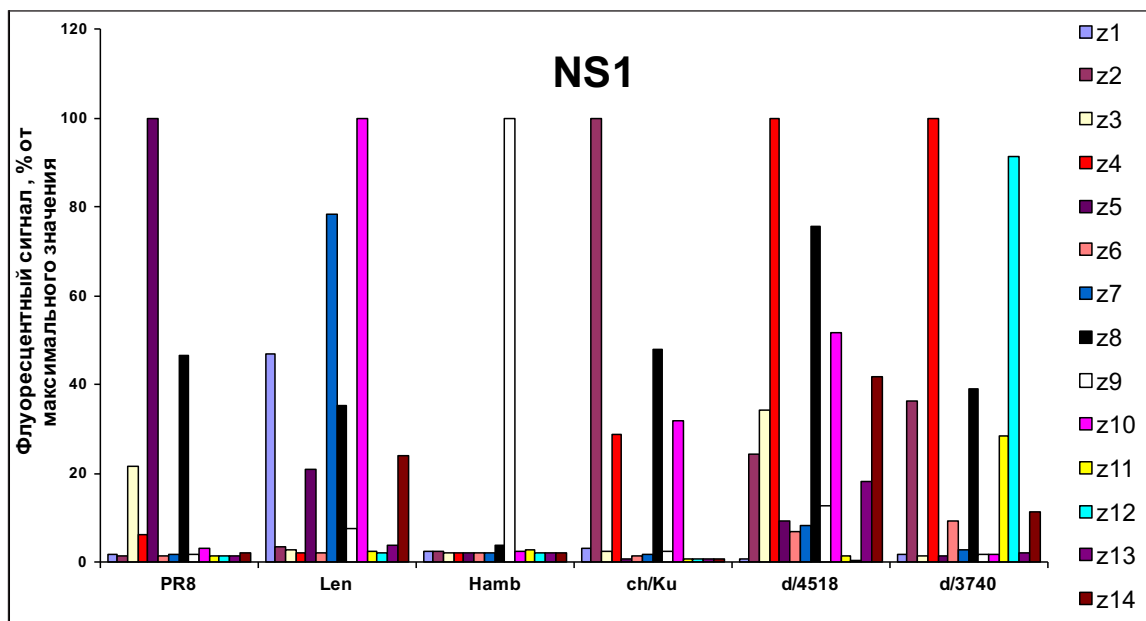


Рис. 2. Шесть характерных профилей связывания вирусов с 14 зондами к гену, кодирующему белок NS1. Здесь и далее зонды обозначены как «z».

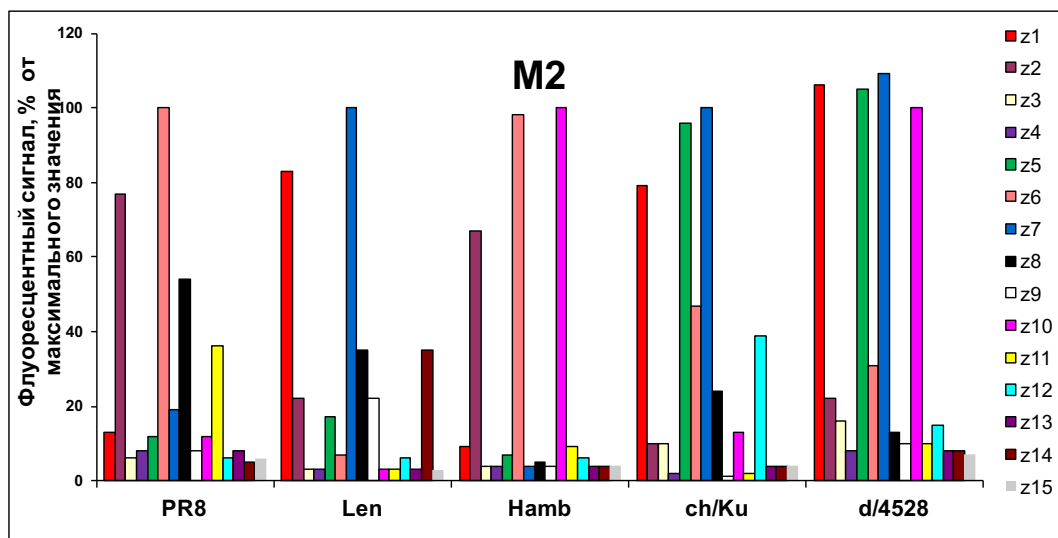


Рис. 3. Пять характерных профилей связывания вирусов с 15 зондами к гену, кодирующему белок M2.

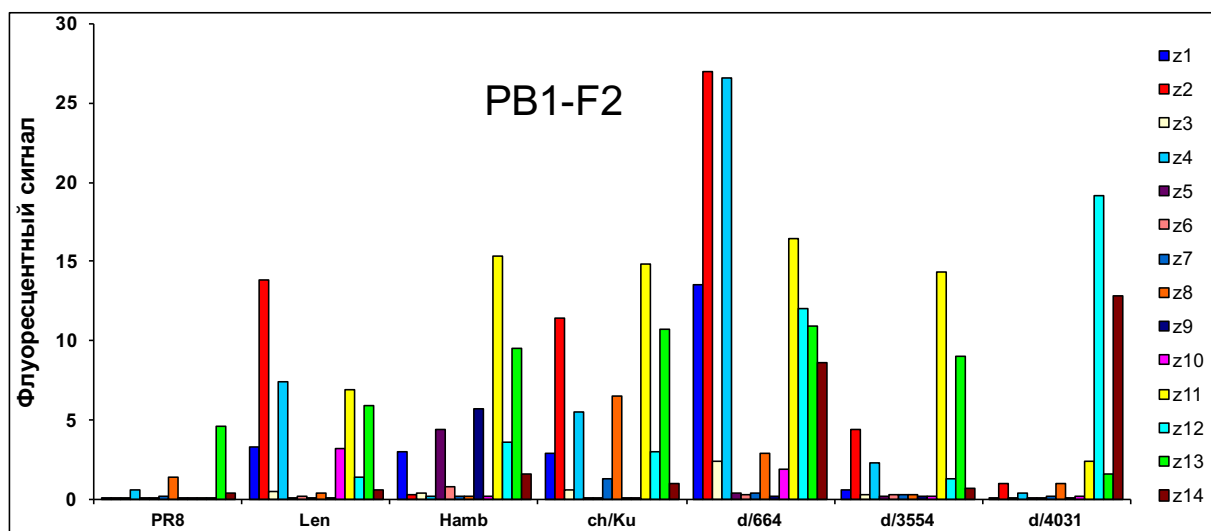


Рис. 4. Семь характерных профилей связывания вирусов с 14 зондами к гену, кодирующему белок PB1-F2

одновременном заражении КЭ двумя родительскими штаммами и последующем выращивании в селективных условиях [20]. Вакцинный штамм представляет собой реассортант с двумя генами, кодирующими белки HA и NA от эпидемического родительского вируса, и шестью остальными генами от донора аттенуации. Контроль состава генома реассортантов – исключительно важная практическая задача. Для ее решения в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия) разработан экспресс-метод микс-ПЦР, позволяющий определять состав генома реассортантов [21]. По сравнению с микс-ПЦР биочип имеет ряд преимуществ при определении состава генома вируса: 1) отпадает необходимость иметь специфические праймеры ко всем генам всех используемых в работе вирусов, 2) высокая производительность и 3) низкая стоимость.

В данном исследовании мы проанализировали 5 экспериментальных реассортантов по генам HA, NA, PB1, NS и M. Донорами поверхностных белков были вирусы VN-PR (H5N1) и Hamb (H1N1). Донором аттенуации служил холодоадаптированный вирус Len (H2N2). Анализ связывания на микрочипе позволил не только однозначно определить происхождение генов HA, NA, PB1, NS и M в реассортантах, но и распознать образцы, в которых присутствовала смесь генов обоих родителей. На Рис. 5 приведены профили связывания родительских вирусов Len и Hamb и экспериментального реассортанта 4886 с зондами к гену, кодирующему белок NS1. Видно, что профиль штамма 4886 является наложением профилей обоих родителей, то есть, содержит смесь генов NS родительских вирусов.

Все экспериментальные реассортанты содержали ген, кодирующий белок NA от донора поверхностных белков. Реассортанты с H5 HA содержали ген NA N2 от донора Len (H2N2), а реассортанты вируса Hamb (H1N1) – ген NA N1 от родительского штамма Hamb.

Однако только в двух штаммах (3697 и 4888) гены PB1, NS и M были от донора аттенуации Len. Штамм 4760 содержал ген PB1 вируса PR8 и смесь генов M – от Len и PR8. Штамм 4885 содержал гены PB1 и M вируса Hamb и смесь генов NS – от обоих родителей. Штамм 4886 содержал ген PB1 от Len, а NS и M – от обоих родителей (Табл. 3).

### Анализ происхождения генов природных изолятов

В отдельных случаях микрочип «Биогрипп» позволяет определить эволюционное происхождение генов в природных изолятах вирусов гриппа.

Так, по профилям связывания с зондами 7–14 к гену NS1 вирусы диких птиц четко разделились на две группы. В первую группу вошли изоляты – и их большинство, – которые практически не взаимодействовали с зондами 11 и 12 и хорошо связывались с зондами 8, 9, 10 и 14. Вирусы второй группы, напротив, хорошо связывались с зондом 12 и совершенно не взаимодействовали с зондами 9 и 10. Изоляты d/4518 и d/3740 являются характерными представителями вирусов первой и второй групп соответственно (Рис. 2). Секвенирование выборочных штаммов каждой из групп позволило установить, что эти различия обусловлены тем, что вирусы содержат ген NS1 двух разных эволюционных линий – А или В [15]. Эти линии, разошедшиеся около 200 лет назад, отличаются 8 нуклеотидами на участке 655–700, перекрываемом зондами 8–12. Таким образом, можно уверенно отнести гены NS1 всех изученных утиных вирусов к определенной эволюционной линии.

Вирусы гриппа подтипов H5N1 и H5N3 по профилям связывания с зондами к HA разделились на две группы по двум параметрам. Во-первых, высокопатогенный штамм ch/Ku (H5N1) связывал зонды к полиосновному участку расщепления HA, а непатогенные вирусы диких уток (H5N3) – не связывали.

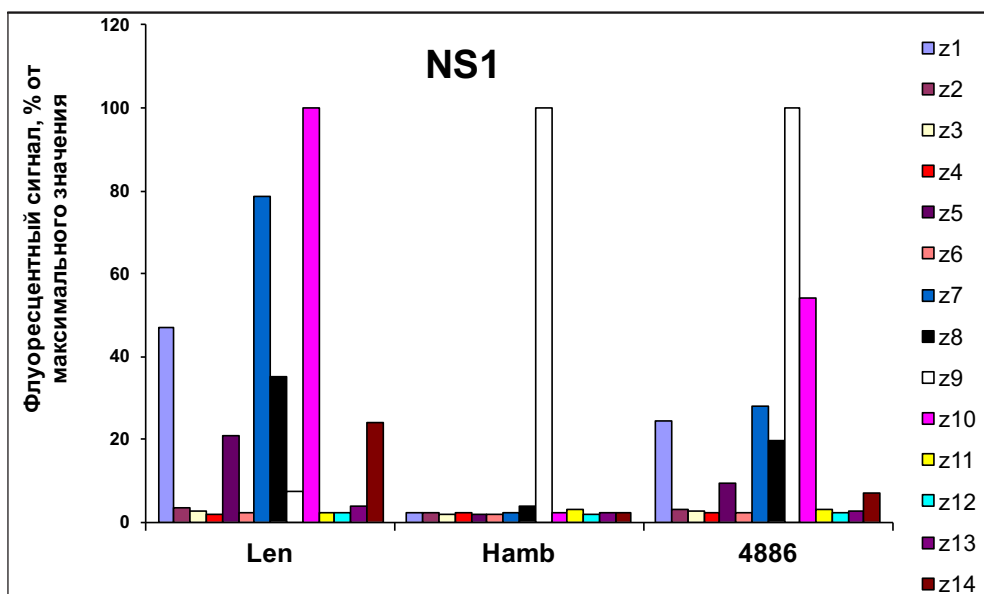


Рис. 5. Профили связывания родительских (Len и Hamb) и реассортантного (4886) вирусов с зондами к гену, кодирующему белок NS1.

**Таблица 3.** Характерные признаки родительских и реассортантных вирусов, по которым можно судить о геномном составе реассортантов

Вирус	HA	NA	PB1-F2		NS1			M2	
			Стоп-кодон <sup>a</sup>	Вирус <sup>b</sup>	PDZ <sup>a</sup>	Стоп-кодон <sup>a</sup>	Вирус <sup>b</sup>	А.к. 27, А.к. 31 <sup>c</sup>	Вирус <sup>b</sup>
Len	H2	N2	-	Len	RSKV	+7	Len	V, S	Len
PR8	H1	N1	-	PR8	RSEV	0	PR8	A, N	PR8
Hamb	H1	N1	11, 57	Hamb	-	-11	Hamb	V, N	Hamb
VN-PR	H5	N1	-	PR8	RSEV	0	PR8	A, N	PR8
Реассортанты									
3697	H5	N2	-	Len	RSKV	+7	Len	V, S	Len
4760	H5	N2	-	PR8	RSKV	+7	Len	A/V, N/S	PR+Len
4885	H1	N1	11, 57	Hamb	RSKV	-11, +7	Len+Hamb	V, N	Hamb
4886	H1	N1	-	Len	RSKV	-11, +7	Len+Hamb	V, N/S	Len+Hamb
4888	H1	N1	-	Len	RSKV	+7	Len	V, S	Len

<sup>a</sup> Цифрами обозначены позиции стоп-кодонов в соответствующих генах: «-» – отсутствие стоп-кодона в рамке считывания PB1-F2, 0 – стандартная позиция стоп-кодона в рамке считывания NS1.

<sup>b</sup> Принадлежность гена реассортанта на основе характерного профиля связывания с зондами.

<sup>c</sup> Последовательность лиганда PDZ-домена.

<sup>d</sup> Аминокислоты в позициях 27 и 31 белка M2.

Во-вторых, вирусы H5N1 преимущественно связывались с зондом 1 из набора, распознающего H5 HA, а вирусы H5N3 лучше всего связывались с зондами 3 и 4 (Рис. 5). Таким образом, профили связывания позволяют распознать эволюционную ветвь HPAIV H5N1 и могут быть маркерами высокопатогенных вирусов.

Особый интерес представлял штамм d/664 (H3N1), так как это единственный в нашей практике вирус гриппа, выделенный от диких уток и оказавшийся патогенным для мышей. По профилю связывания с зондами к гену HA этот вирус отличается от всех остальных H3-вирусов, к гену NA N1 – близок к профилям высокопатогенных H5N1 вирусов, а к гену PB1-F2 – напоминает таковой для вирусов гриппа подтипа H2N2, выделенных от человека (Рис. 6, 7 и 8). Конечно, по этой информации невозможно судить о причинах патогенности вируса d/664, но ее достаточно, чтобы обратить на него пристальное внимание. В дальнейшей работе предполагается провести полногеномное секвенирование этого вируса.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проанализировано 42 природных изолята вируса гриппа А субтипов H1N1, H3N1, H3N2, H3N6, H3N8, H4N6, H5N3, H6N2, H7N9, H9N2 и H11N9 на наличие известных на сегодняшний день и описанных в литературе факторов патогенности [9, 10, 12]. В результате выявлено, что такие маркеры, как последовательность ESEV лиганда PDZ-домена в вирусном белке NS1 и замена N66S в рамке считывания вирусного белка PB1-F2, в контексте генома вирусов гриппа диких уток не связана с патогенностью вируса для мышей. Все исследованные нами вирусы эффективно инфицировали мышей, вызывали сильный прирост специфических антител, но не приводили к заболеванию – никаких клинических симптомов не зарегистрировано. Это лишний раз подтверждает,

какой сложной и многофакторной характеристикой является патогенность. Среди исследованных штаммов высокопатогенными, то есть вызывающими гибель мышей при низких дозах заражения, были вирусы гриппа подтипа H5N1: ch/Ku и реассортант VN-PR, – а также вирус d/664 (H3N1). Первый из перечисленных – классический высокопатогенный вирус, несмотря на наличие N66 в белке PB1-F2. Его патогенность, в частности, определяется полиосновной последовательностью в сайте нарезания белка HA. Реассортант VN-PR лишен полиосновного сайта и прочих формальных маркеров патогенности (содержит NS1, терминированный RSEV; N66 в PB1-F2 и сайт нарезания, расщепляемый только секреторными сериновыми протеазами), но его патогенность для мышей мало отличается от патогенности ch/Ku: он вызывает гибель мышей при заражении дозой 2.0 lg ЭИД<sub>50</sub>. И, наконец, высокопатогенный вирус из нашей коллекции – d/664 – по маркерам не отличается от других вирусов подтипа H3N1, не вызывающих у мышей никаких клинических симптомов. Вирус человека Hamb также вызывал заболевание мышей с падением веса (неопубликованные данные), несмотря на характерные признаки, которые принято считать аттенуирующими: отсутствие белка PB1-F2 и отсутствие лиганда PDZ-домена за счёт укорочения белка NS1 (Табл. 3).

Таким образом, патогенность в большей степени определяется не отдельными аминокислотными заменами, а является характерным свойством вирусов конкретных эволюционных линий. Микрочип «Биогрипп» позволяет не только субтипировать HA и NA, но и, в отдельных случаях, определять эволюционные линии генов, кодирующих поверхностные и внутренние белки вирусов гриппа. В сочетании с возможностью одновременно анализировать большое число образцов по многим параметрам микрочип может быть полезен для мониторинга эволюционных линий



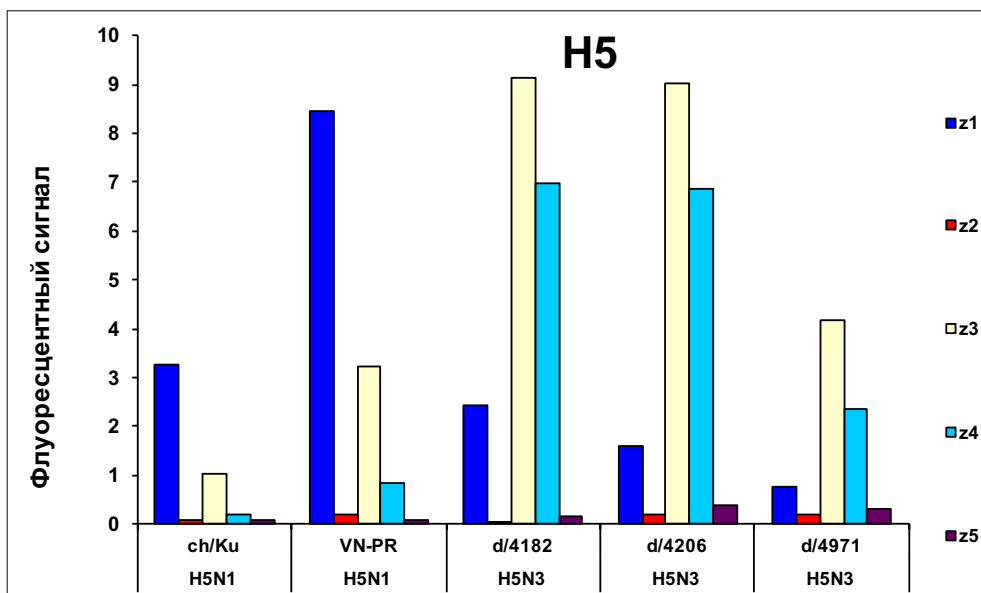


Рис. 6. Профили связывания вирусов с зондами к гену *HA* подтипа H5.

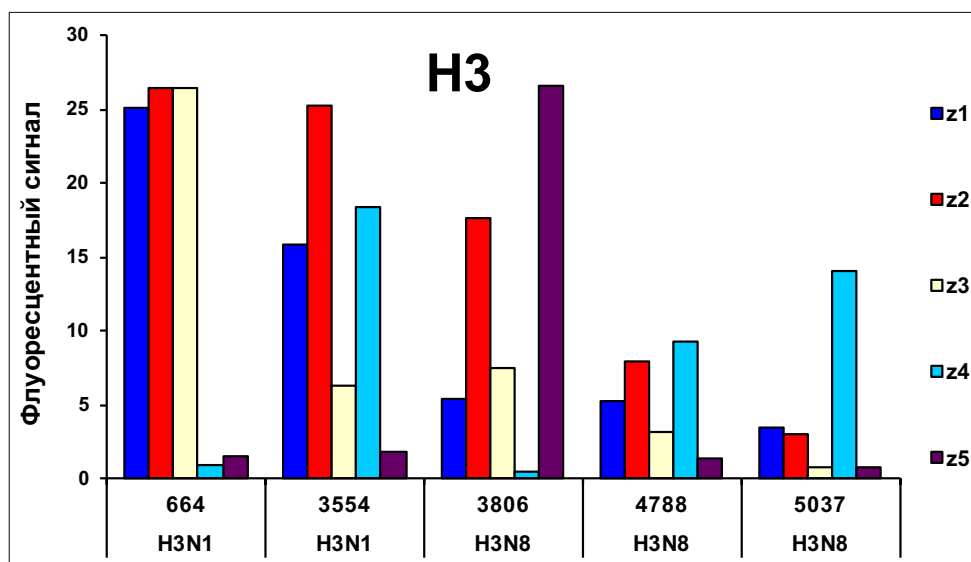


Рис. 7. Профили связывания вирусов с зондами к гену *HA* подтипа H3.

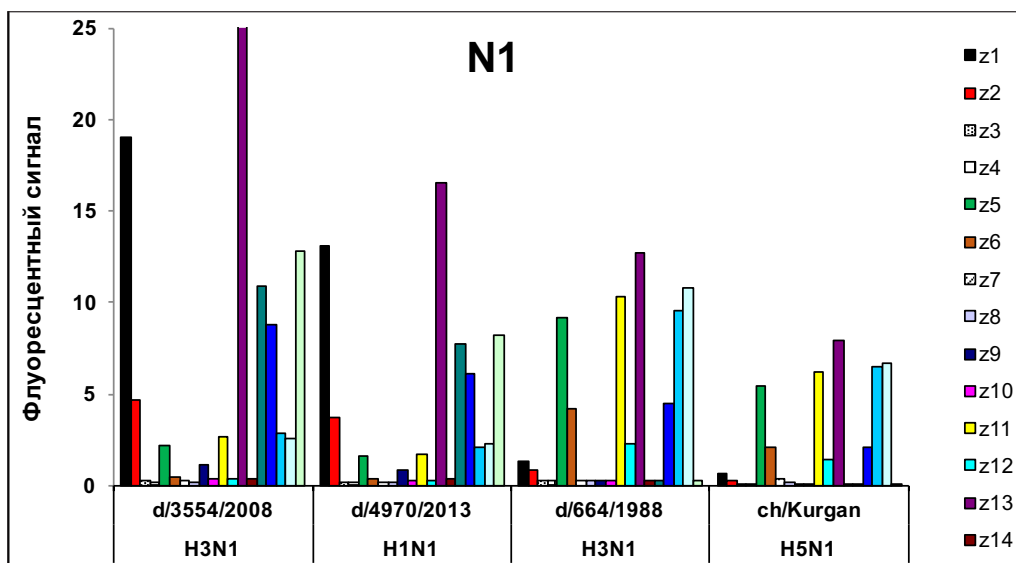


Рис. 8. Профили связывания вирусов с зондами к гену *NA* подтипа N1.

патогенных вирусов гриппа в природе. Использованный нами набор зондов был создан в первую очередь для анализа вирусов гриппа человека. Возможно, для анализа вирусов гриппа из дикой природы имеет смысл сконструировать и использовать дополнительные зонды – для не вошедших в данный набор генов вирусов гриппа, – что позволит распознавать потенциально опасные эволюционные ветви разных генов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Д. А. Грядуну, зам. директора по науке ИМБ РАН, – за организационную помощь в проведении исследований на микрочипах, проф. Л. Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия) – за предоставление донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), д-ру М. Н. Матросовичу (Institute of Virology, Philipps University, 35043 Marburg, Germany) – за предоставление вируса A/Hamburg/5/2009, д-ру R. Donis (CDC, США) – за предоставление вакцинного штамма A/Vietnam/1203/2004 × A/Puerto Rico/8/34, д-ру Ron A. M. Fouchier (Department of Virology, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands) – за предоставление вируса A/mallard/Sweden/91/2002 (H7N9), д.б.н. С. С. Ямниковой – за предоставление вируса A/duck/

Buryatia/664/1988. Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00547-а.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

## ЦИТИРОВАНИЕ

Гейдаров РН, Ломакина НФ, Боравлева ЕЮ, Холодилов ИС, Гамбарян АС, Михайлович ВМ, Фесенко ЕЕ. Применение микрочипов для идентификации происхождения генов вирусов гриппа диких птиц. *MIR J*, 2017; 4(1), 10-20, doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-10-20.

## АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2017 Гамбарян и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992; 56(1), 152-79. PubMed PMID: 1579108.
2. Alexander DJ. Should we change the definition of avian influenza for eradication purposes? *Avian Dis*. 2003; 47(3 Suppl), 976-81. doi: 10.1637/0005-2086-47.s3.976.
3. Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schroer D, Vahlenkamp TW, et al. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol*. 2009; 83(11), 5864-8. doi: 10.1128/JVI.02649-08.
4. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, et al. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol*. 2001; 146(5), 963-73. doi: 10.1007/s007050170128.
5. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. 2001; 293(5536), 1840-2. doi: 10.1126/science.1062882.
6. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(51), 18590-5. doi: 10.1073/pnas.0507415102.
7. Imai H, Shinya K, Takano R, Kiso M, Muramoto Y, Sakabe S, et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog*. 2010; 6(9), e1001106. doi: 10.1371/journal.ppat.1001106.
8. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001; 7(12), 1306-12. doi: 10.1038/nm1201-1306.
9. Conenello GM, Tisoncik JR, Rosenzweig E, Varga ZT, Palese P, Katze MG. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol*. 2011; 85(2), 652-62. doi: 10.1128/JVI.01987-10.
10. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*. 2007; 3(10), 1414-21. doi: 10.1371/journal.ppat.0030141.
11. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*. 2002; 8(9), 950-4. doi:10.1038/nm757.
12. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol*. 2008; 82(3), 1146-54. doi: 10.1128/JVI.01698-07.

13. Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(11), 4381-6. doi: 10.1073/pnas.0800482105.
14. Heydarov RN, Fesenko EE, Shaskolskiy BL, Klotchenko SA, Vasin AV, Titov SV, et al. Identification of genetic determinants of influenza A virus resistance to adamantanes and neuraminidase inhibitors using biological microarray. *Dokl Biochem Biophys*. 2015; 460, 4-8. doi: 10.1134/S1607672915010032.
15. Worobey M, Han GZ, Rambaut A. A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature*. 2014; 508(7495), 254-7. doi: 10.1038/nature13016.
16. Боравлева ЕЮ, Ломакина НФ, Гамбарян АС. Выделение вирусов гриппа А от птиц на водоёмах Москвы. *Казарка*. 2012; 15(2), 13-30.
17. Boravleva EY, Chvala IA, Lomakina NF, Repin PI, Mudrak NS, Rudenko LG, et al. Testing of a pathogenic influenza virus H5N3 as a poultry live vaccine. *Vopr Virusol*. 2015; 60(4), 44-9. PubMed PMID: 26665435.
18. Gambaryan AS, Boravleva EY, Lomakina NF, Kropotkina EA, Gordeychuk IV, Chvala IA, et al. Immunization with live nonpathogenic H5N3 duck influenza virus protects chickens against highly pathogenic H5N1 virus. *Acta Virol*. 2016; 60(3), 316-27. doi: 10.4149/av\_2016\_03\_316.
19. Lomakina NF, Boravleva EY, Kropotkina EA, Yamnikova SS, Drygin VV, Gambaryan AS. Attenuation of A/Chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) influenza virus using selection in an environment simulating the life cycle of wild duck viruses. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2011; 26, 132-139. doi: 10.3103/S0891416811030025.
20. Alexandrova GI, Polezhaev FI, Budilovsky GN, Garmashova LM, Topuria NA, Egorov AY, et al. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: reactogenicity and antigenic activity of cold-adapted recombinants and analysis of isolates from the vaccinees. *Infect Immun*. 1984; 44(3), 734-9. PubMed PMID: 6724695.
21. Киселева ИВ, Voeten JTM., Teley LC, Ларионова НВ, Дубровина ИА, Бердыгулова ЖА, Баженова ЕА, van den Bosch H, Heldens JG, Руденко ЛГ. Анализ состава генома штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 4, 29-36.