

ИНДУКЦИЯ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ Т- И В-КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВИРУСУ ГРИППА А (H5N1) У ЛЮДЕЙ, ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ А(H5N2)

**Лосев И.В.¹, Дони́на С.А.¹, Петухова Г.Д.¹, Кореньков Д.А.¹,
Ерофеева М.К.², Стукова М.А.², Руденко Л.Г.¹, Найхин А.Н.¹**

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы в мировой вирусологии активно развивается новая стратегия вакцинации людей против потенциально пандемических вирусов гриппа А: комбинационная вакцинация (prime-boost vaccination). Она предусматривает усиление (бустирование) иммунного ответа к одной вакцине с помощью предварительной прививки (праймирование) другой вакциной. Нами впервые изучен вопрос об иммунологических последствиях для людей праймирования отечественной живой гриппозной вакциной ЖГВ H5N2 с последующим (через 1,5 года) их бустированием отечественной инактивированной гриппозной вакциной ИГВ H5N1. В отличие от непраймированных волонтеров у праймированных после однократной прививки ИГВ H5N1 наблюдалась ускоренная и усиленная продукция сывороточных антител (РТГА, РМН, ИФА). Это касалось антител к вакцинному штамму А (H5N1) и другим гетерологичным штаммам с гемагглютинином H5. У праймированных лиц антитела обладали более высокой авидностью по сравнению с непраймированными. Перед прививкой ИГВ H5N1 у первых титры IgG-антител к вирусу А(H5N1), а также уровень специфических к нему CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти оказались выше, чем у вторых. Бустлирующий эффект ИГВ H5N1 не коррелировал с данными РТГА и РМН по иммуногенности праймирующей ЖГВ H5N2. В целом полученные результаты обосновывают новое направление в использовании отечественных ЖГВ для защиты от потенциально пандемического вируса гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа, иммунологическая память, вакцина гриппозная, пандемические вирусы гриппа

INDUCTION OF LONG-TERM T AND B CELL MEMORY IMMUNITY TO INFLUENZA A VIRUS (H5N1) IN PERSONS VACCINATED WITH LIVE INFLUENZA A VACCINE (H5N2)

**Losev I.V.^a, Donina S.A.^a, Petukhova G.D.^a, Korenkov D.A.^a,
Erofeeva M.K.^b, Stukova M.A.^b, Rudenko L.G.^a, Naykhin A.N.^a**

^a Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Over last years, a novel strategy for vaccination of people against potentially pandemic influenza A viruses is actively developed worldwide, i.e., a combined (prime-boost) vaccination. It provides amplification

Адрес для переписки:

Лосев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Address for correspondence:

Losev Igor V.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Г.Д. Петухова, Д.А. Кореньков,
М.К. Ерофеева, М.А. Стукова, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин
«Индукция долговременной Т- и В-клеточной
иммунологической памяти к вирусу гриппа А (H5N1)
у людей, привитых живой гриппозной вакциной А(H5N2)»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 375-386.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

For citation:

I.V. Losev, S.A. Donina, G.D. Petukhova, D.A. Korenkov,
M.K. Erofeeva, M.A. Stukova, L.G. Rudenko, A.N. Naykhin
“Induction of long-term T and B cell memory immunity to
influenza A virus (H5N1) in persons vaccinated with live
influenza A vaccine (H5N2)”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 375-386.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

© Лосев И.В. и соавт., 2017

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

(boosting) of immune response for a vaccine by means of pre-vaccination (priming) with another vaccine. We have first studied an issue of immunological consequences for people after priming by live attenuated influenza H5N2 vaccine (LAIV), followed by a boost with inactivated influenza H5N1 vaccine (IIV) 1.5 years later. Unlike non-primed volunteers, the primed persons developed more rapid and high production of serum antibodies (of HAI-, MN-, ELISA-types) after a single vaccination with H5N1 IIV. That concerned induction of antibodies to the H5N1 vaccinal strain A, and other heterologous strains containing H5 haemagglutinin. In primed persons, the antibodies showed higher avidity as compared to non-primed individuals. Before inoculation with H5N1 IIV, the IgG-antibody titers to A virus (H5N1), and the levels of specific CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells proved to be higher in primed subjects than in non-primed persons. The boosting effect of H5N1 IIV did not correlate with HAI- and MN-based data on immunogenicity of priming H5N2 live attenuated vaccine. In general, the results obtained justify a new direction in applications of LAIVs for protection against potentially pandemic influenza virus A.

Keywords: influenza virus, immunological memory, influenza vaccina, pandemic influenza A viruses

Введение

Вирусы гриппа А вызывают ежегодные сезонные эпидемии и пандемии. Этиологическими агентами пандемий являются сероподтипы вируса с обновленным гемагглютинином (НА). В последнее столетие зафиксированы пандемии гриппа А(H1N1), А(H2N2) и А(H3N2). С 2001 г. среди людей периодически регистрируются вспышки гриппа А, вызванные птичьими вирусами с НА Н5, Н7 и Н9. Вспышки гриппа А(H5N1) и А(H7N9) сопровождались тяжелыми клиническими проявлениями с высокой летальностью. Это побудило к созданию под эгидой ВОЗ резервных живых аттенуированных (ЖГВ) и инактивированных (ИГВ) гриппозных вакцин, включающих потенциально пандемические птичьих вирусы гриппа А(H5N1), А(H5N2), А(H6N1), А(H7N3), А(H7N9) и А(H9N2) [19]. Все эти вакцины были ареактогенны. Однако они вызывали у добровольцев довольно слабый гуморальный иммунный ответ по интенсивности индукции сывороточных антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител. Данное обстоятельство послужило побудительным моментом для использования так называемой комбинационной стратегии вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А [15]. Она основана на предварительной иммунизации (праймировании) людей одной вакциной для достижения усиленного (бустированного) иммунного ответа на последующее введение другой вакцины. Подразумевается, что праймирование может формировать долговременную клеточную иммунологическую память, которая усилит, ускорит и расширит спектр иммунного ответа на буст-вакцину.

Эффективность режима «праймирование – бустирование» показана на вакцинах против ряда инфекционных агентов, включающих ВИЧ, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium malariae* [15]. Изучался данный вопрос и в отношении вакцинации против потенциально пандемических птичьих вирусов гриппа А, в подавля-

ющем большинстве – применительно к защите от вируса А(H5N1). Так, использование праймирующей неадьювантной ИГВ H5N3 для бустирования иммунного ответа у людей на неадьювантную ИГВ H5N1 не дало ожидаемого эффекта из-за низкой иммуногенности первой, тогда как праймирующая адьювантная ИГВ H3N2 бустировала гуморальный иммунный ответ на ИГВ H5N1 [16]. Бустирование гуморального иммунного ответа на ИГВ H5N1 отмечено при применении в качестве праймирующих рекомбинантной H5-вакцины [10], ДНК-вакцин H5N1 [14] и аденовирусной векторной вакцины H5N1 [14]. Недавно американскими авторами показано, что отдаленное (5 лет назад) праймирование волонтеров ЖГВ H5N1 мощно бустировало продукцию сывороточных антител после прививки ИГВ H5N1 [18]. В настоящей статье проанализирован вопрос возможности бустирования у людей иммунного ответа отечественной ИГВ H5N1 с помощью отдаленной во времени (1,5 года назад) прививки отечественной ЖГВ H5N2.

Материалы и методы

Волонтеры и вакцины

Рандомизированным двойным слепым методом волонтеры 18-46 лет были разделены на две группы: привитые двукратно в 2012 г. (18 месяцев назад) отечественной ЖГВ H5N2 (опытная группа) и не прививавшиеся этим препаратом (контрольная группа). Обе группы в 2014 г. вакцинировали двукратно отечественной субъединичной адсорбированной ИГВ «Orny Flu» производства ФГУП «НПО «Микроген». Каждая доза вакцины (0,5 мл) содержала 15 мкг гемагглютинина вируса гриппа А(H5N1). Венозную кровь отбирали до прививки (Д0), через 7 дней после первой прививки (Д7), через 28 дней после первой прививки (Д28) и через 28 дней после второй прививки (Д56). По полу и возрасту группы существенно не различались. Испытания проведены в полном соответствии с национальным стандартом Рос-

сийской Федерации (ГОСТ 352379-2005) «Надлежащие клинические испытания»

Праймирующая ЖГВ Н5N2 разработана в отделе вирусологии НИИЭМ из штамма А/17/инд/Турция/05/133(Н5N2). В результате реассортации эта вакцина включала модифицированный гемагглютинин Н5 от вируса данного вакцинного штамма, нейраминидазу N2, а также все внутренние белки от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2).

Определение сывороточных антигемагглютинирующих антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) выполняли по общепринятой методике. Рабочая доза антигена составляла 4 АЕ при использовании 1% лошадиных эритроцитов. Достоверными увеличениями (конверсиями) титров антител считали их поствакцинальное возрастание в 4 и более раза по отношению к довакцинальному уровню.

Определение сывороточных антител в реакции микронейтрализации (РН) проводили на культуре клеток МДСК по методике ВОЗ [17]. Достоверными конверсиями титров антител считали их поствакцинальное повышение в 4 и более раза в сравнении с довакцинальным уровнем.

Определение сывороточных IgA- и IgG-антител в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли по ранее описанной методике [4], используя в качестве подложки 16 АЕ антигена (вакцинного штамма), очищенного и сконцентрированного в 30-60% градиенте плотности сахарозы. За титр антител сывороток крови принимали последнее разведение образца, оптическая плотность (ОП) которого превышала в 2 и более раза среднее арифметическое значение ОП контрольных лунок (все компоненты, кроме образцов сывороток крови). Достоверными конверсиями титров антител считали их поствакцинальное повышение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному уровню.

Определение авидности сывороточных IgA- и IgG-антител в ИФА осуществляли по ранее разработанной методике с расчетом индексов их авидности [1].

Определение вирусспецифических CD8⁺Т-лимфоцитов памяти в проточной цитофлюориметрии

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли на градиенте, отмывали и хранили в жидком азоте до исследования. Для выявления специфичных к вирусу Т-клеток использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [11] после стимуляции клеток *in vitro* 12 МОИ очищенного вакцинного штамма. Для определения спонтанной

продукции интерферона вместо стимулятора к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640. При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. В качестве положительного контроля использовалась стимуляция клеток стафилококковым энтеротоксином В, который вызывает массовую неспецифическую активацию Т-лимфоцитов. После разморозки клетки волонтеров, отобранные во всех временных точках, были способны к активации и продукции IFN γ . CD8⁺Т-лимфоциты центральной (T_{cm}) и эффекторной (T_{em}) иммунологической памяти определяли по фенотипу, соответственно, CD8⁺IFN⁺CCR7⁺CD45RA⁻ и CD8⁺IFN⁺CCR7⁻CD45⁻ [11]

Определение в надосадках культур МПК плазмобластных поликлональных антител (plasmablast-derived polyclonal antibody – PPAб) проводили по методике [3, 12]. МПК выделяли на градиенте стандартным методом. Полученные клетки культивировали в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации собирали надосадки культур МПК, которые очищали центрифугированием. Полученные образцы замораживали при температуре -20 °С до исследования в ИФА по той же технологии, что и сывороточные IgA- и IgG-антитела.

Статистическую обработку результатов выполнили с использованием программного обеспечения Statistica 6 и GraphPad Prizm 5. Для сравнения данных применяли следующие тесты: Wilcoxon Matched Pairs Test, Friedman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

В таблицах 1-3 представлены данные о поствакцинальном гуморальном иммунном ответе волонтеров на прививку ЖГВ Н5N2 в 2012 г. (праймирование) и последующую прививку ИГВ Н5N1 в 2014 г. (бустирование). Контрольной группой служили непримированные лица, иммунизированные только ИГВ Н5N1 в 2014 г. Выявляли пулы сывороточных антигемагглютинирующих (РТГА) и вируснейтрализующих (РН) антител, а также сывороточных IgA- и IgG-антител (ИФА). Иммунный ответ определяли как к праймирующему А(Н5N2), так и к бустирующему А(Н5N1) вирусам.

При анализе этих результатов обращают на себя внимание следующие факты.

Первый – перед прививкой ИГВ Н5N1 (D0) средние геометрические титры (СГТ) антител

ТАБЛИЦА 1. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ АНТИГАММАГЛЮТИНИРУЮЩИХ (РТГА) И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ (РМН) СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ВОЛОНТЕРОВ ПРАЙМИРУЮЩЕЙ ЖГВ H5N2 И БУСТИРУЮЩЕЙ ИГВ H5N1

TABLE 1. INTENSITY OF HAI ANTIBODIES AND NEUTRALIZING ANTIBODIES PRODUCTION IN VOLUNTEERS AFTER PRIMING WITH LAIV H5N2 FOLLOWED BY IIV H5N1 BOOST

Лабораторный тест Laboratory test	Вирус гриппа А Influenza A virus	Обратные величины средних геометрических титров (СГТ) антител Serum antibody geometric mean titers (GMT)														
		Прививка ЖГВ H5N2 в 2012 г. – праймирование волонтеров (N = 19) Vaccination with LAIV H5N2 in 2012, primed volunteers (N = 19)				Прививка ИГВ H5N1 в 2014 г. тех же лиц – бустирование волонтеров (N = 19) Vaccination with IIV H5N1 in 2014 (same group), boost (N = 19)				Прививка ИГВ H5N1 в 2014 г. контрольной группы волонтеров – непраймированные ЖГВ H5N2 люди (N = 24) Vaccination with IIV H5N1 in 2014, control group of volunteers without LAIV H5N2 priming (N = 24)						
		Д0* D0	Д28* D28	Д56* D56	Д56/Д0 D56/D0	Д0 D0	Д7 D7	Д28 D28	Д56 D56	Д7/Д0 D0/D7	Д28Д56/Д0 D28D56/D0	Д0 D0	Д7 D7	Д28 D28	Д56 D56	Д7/Д0 D7/D0
РТГА HAI assay	H5N2**	3	4	5	2,5	3	6 ¹	43 ²	2,0	20,7	3	3 ¹	6 ²	8 ³	1,0	2,5
	H5N1**	3	3	3	1,0	3	8 ⁴	32 ⁵	2,5	15,0	3	3 ⁴	6 ⁵	9 ⁶	1,0	3,0
РМН MIN	H5N2	5	6	11	2,0	14 ⁷	138 ⁸	398 ⁹	9,2	26,5	6 ⁷	25 ⁸	57 ⁹	147 ¹⁰	4,2	24,5
	H5N1	n/a***	n/a***	n/a***	n/a***	8	67 ¹¹	166 ¹²	8,4	30,0	6	16 ¹¹	32 ¹²	73 ¹³	2,5	12,2

Примечание. Цифры 1-13 означают достоверные отличия СГТ антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,01; 3 – p < 0,001; 4 – p < 0,05; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,01; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,01; 11 – p < 0,001; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,001.

* – Д0 – до прививки; Д7 – через 7 дней после 1-й прививки; Д28 – через 28 дней после 1-й прививки; Д56 – через 28 дней после 2-й прививки. Д7/Д0, Д28/Д0 и Д56/Д0 – кратность прироста СГТ антител.

** – H5N2 – А/индюк/Турция/05/133; H5N1 – NIBRG-23.

*** – не исследовали.

Note. Numbers 1 to 13 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,01; 3 – p < 0,001; 4 – p < 0,05; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,01; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,01; 11 – p < 0,001; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,001.

* – D0, before vaccination; D7 – 7 days after the 1st vaccination; D28 – 28 days after the 1st vaccination; D56 – 28 days after the 2nd vaccination. D7/D0, D28/D0 denote fold changes in antibody GMT.

** – H5N2 – A/turkey/Turkey/05/133; H5N1 – NIBRG-23.

*** – n/a – not applicable.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА КОНВЕРСИЙ АНТИГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ (РТГА) И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ (РМН) СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ВОЛОНТЕРОВ ПРАЙМИРУЮЩЕЙ ЖГВ Н5N2 И БУСТИРУЮЩЕЙ ИГВ Н5N1

TABLE 2. FREQUENCY OF HAI AND NEUTRALIZING ANTIBODY CONVERSION IN VOLUNTEERS AFTER LAIV H5N2 PRIMING FOLLOWED BY IIV H5N1 BOOST

Лабораторный тест Laboratory test	Штамм вируса гриппа А Influenza A virus	% лиц с конверсиями антител (АТ) и % лиц с защитными титрами АТ % of persons with Ab conversions, and % of persons with protective titers											
		После прививки ЖГВ Н5N2 в 2012 г. – праймирование волонтеров (N = 19) Vaccination with LAIV H5N2 in 2012, priming of the volunteers (N = 19)			После прививки ИГВ Н5N1 в 2014 г. тех же лиц – бустирование волонтеров (N = 19) Vaccination with IIV H5N1 in 2014 (same group), boost (N = 19)			После прививки ИГВ Н5N1 в 2014 г. контрольной группе волонтеров – непраймированные ЖГВ Н5N2 люди (N = 24) Vaccination with IIV H5N1 in 2014, control group of volunteers without LAIV H5N2 priming (N = 24)					
		Д28* D28	Д56* D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40	Д7* D7	Д28 D28	Д56 D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40	Д7 D7	Д28 D28	Д56 D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40	
РТГА HAI assay	NIBRG-23 (H5N1)	0	0	0	26 ¹	58 ²	73	58 ³	73 ⁴	29 ²	50	12 ³	29 ⁴
	A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	0	0	0	42 ⁵	63	79	63 ⁶	73 ⁷	42	54	17 ⁶	38 ⁷
	A/turkey/ Turkey/05/133 (H5N2)	21	42	0	26 ⁸	68 ⁹	79 ¹⁰	58 ¹¹	63 ¹²	25 ⁹	41 ¹⁰	13 ¹¹	21 ¹²
РМН MIN	A/duck/ Potsdam/86/92 (H5N2)	21	37	0	37 ¹³	74 ¹⁴	74 ¹⁵	58 ¹⁶	74 ¹⁷	29 ¹⁴	42 ¹⁵	17 ¹⁶	33 ¹⁷
	NIBRG-23 H5N1	НИ	НИ	11	58	95 ¹⁸	100	89 ¹⁹	100	46	67 ¹⁸	46 ¹⁹	87
	A/turkey/ Turkey/05/133 (H5N2)	5	47	0	63	95 ²⁰	95	100 ²¹	100	46	75 ²⁰	58 ²¹	92

Примечание. Цифры от 1 до 21 означают достоверные отличия показателей антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,05; 3 – p < 0,01; 4 – p < 0,01; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,05; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,05; 11 – p < 0,01; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,05; 14 – p < 0,01; 15 – p < 0,05; 16 – p < 0,05; 17 – p < 0,01; 18 – p < 0,05; 19 – p < 0,05; 20 – p < 0,05; 21 – p < 0,01.
* – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 21 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed pairwise for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – p < 0.05; 2 – p < 0.05; 3 – p < 0.01; 4 – p < 0.01; 5 – p < 0.01; 6 – p < 0.01; 7 – p < 0.05; 8 – p < 0.05; 9 – p < 0.01; 10 – p < 0.05; 11 – p < 0.01; 12 – p < 0.01; 13 – p < 0.05; 14 – p < 0.01; 15 – p < 0.05; 16 – p < 0.05; 17 – p < 0.01; 18 – p < 0.05; 19 – p < 0.05; 20 – p < 0.05; 21 – p < 0.01.
* – As in Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОДУКЦИИ СЫВОРОТОЧНЫХ IgA- И IgG-АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ H5N1
TABLE 3. INTENSITY OF SERUM IgA AND IgG ANTIBODIES PRODUCTION IN VOLUNTEERS VACCINATED WITH IIV H5N1

Лабораторный тест и антитела Laboratory test and antibodies	Группа привитых* Group of volunteers	Показатели продукции антител (АТ) к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) Production of antibodies (Ab) to vaccine virus NIBRG-23 (H5N1)				
		СГТ** АТ Antibody GMTs				
		Д0*** D0	Д7*** D7	Д28*** D28	Д56*** D56	Кратность прироста СГТ АТ Antibody GMT, fold changes
ИФА – IgA IgA ELISA	ИГВ H5N1 (N = 24) IIV H5N1 (N = 24)	7	21 ¹	21 ²	25 ³	Д7/Д0 D7/D0: 3,0 Д28/Д0 D28/D0: 3,0 Д56/Д0 D56/D0: 3,6
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N = 19) LAIV H5N2 + IIV H5N1 (N = 19)	6	55 ¹	69 ²	60 ³	Д7/Д0 D7/D0: 9,2 Д28/Д0 D28/D0: 11,5 Д56/Д0 D56/D0: 10,0
ИФА – IgG IgG ELISA	ИГВ H5N1 (N = 24) IIV H5N1 (N = 24)	170 ⁴	290 ⁵	490 ⁶	633 ⁷	Д7/Д0 D7/D0: 1,7 Д28/Д0 D28/D0: 2,9 Д56/Д0 D56/D0: 3,7
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N = 19) LAIV H5N2 + IIV H5N1 (N = 19)	335 ⁴	745 ⁵	1485 ⁶	1285 ⁷	Д7/Д0 D7/D0: 2,2 Д28/Д0 D28/D0: 4,4 Д56/Д0 D56/D0: 3,8

Примечание. Цифры 1-12 означают достоверные отличия СГТ антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – p < 0,01; 2 – p < 0,01; 3 – p < 0,01; 4 – p < 0,01; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,01; 8 – p < 0,05; 9 – p < 0,05; 10 – p < 0,001; 11 – p < 0,01; 12 – p < 0,01.

* – ИГВ H5N1 – привитые только этой вакциной; ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 – ранее праймированные ЖГВ H5N2 с последующей (через 1,5 года) прививкой ИГВ H5N1.

** , *** – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 12 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – p < 0.01; 2 – p < 0.01; 3 – p < 0.01; 4 – p < 0.01; 5 – p < 0.01; 6 – p < 0.01; 7 – p < 0.01; 8 – p < 0.05; 9 – p < 0.05; 10 – p < 0.001; 11 – p < 0.01; 12 – p < 0.01.
* – IIV H5N1 – vaccinated with IIV H5N1 vaccine only; LAIV + IIV H5N2 H5N1 – priming with LAIV H5N2 followed by (in 1.5 years) IIV H5N1 vaccination.
** and *** – as in Table 1.

ТАБЛИЦА 4. АВИДНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ (IgA И IgG) АНТИТЕЛ (ИФА) К ВАКЦИННОМУ ШТАММУ NIBRG-23 H5N1 У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ H5N1

TABLE 4. AVIDITY OF SERUM IgA AND IgG ANTIBODIES TO VACCINE STRAIN NIBRG-23 H5N1 IN VOLUNTEERS VACCINATED WITH H5N1 IIV (ELISA TESTING)

Лабораторный тест и антитела Laboratory test and antibodies	Группа привитых Group of volunteers	Число лиц с конверсиями антител к вакцинному штамму Number of persons with Ab conversions to the vaccine strain	Из них с достоверным увеличением индекса авидности антител (ИААТ**) Per cent persons with significant (> 15%) increases in AI values	Средние значения ИААТ Arithmetic mean AI		
				Д0*** D0	Д7*** D7	Д28*** D28
IgA	ИГВ H5N1* IIV H5N1	16	0	77,4	83,3	77,9
	ЖГВ H5N2*+ ИГВ H5N1 LAIVH5N2 + IIV H5N1	17	7 (41,2%)	72,7	86,4	84,9
IgG	ИГВ H5N1 IIV H5N1	17	3 (17,6%) ¹	78,3	78,3	77,9 ³
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 LAIVH5N2 + IIV H5N1	11	6 (54,5%) ¹	76,2 ²	86,2	90,6 ^{2,3}

Примечание. Цифры 1-3 означают наличие статистически значимых отличий. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – $p < 0,05$; 2 – $p < 0,05$; 3 – $p < 0,05$.

* – см. примечание к таблице 3.

** – ИААТ вычисляется как отношение оптической плотности в пробе до добавления мочевины к оптической плотности в той же пробе после добавления мочевины. Достоверным считается увеличение ИААТ на 15 и более процентов.

*** – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 3 indicate significance levels for the differences obtained. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – $p < 0.05$; 2 – $p < 0.05$; 3 – $p < 0.05$.

* – as in Table 3.

** – AI values were calculated as a ratio of OD value for a native sample to OD of this sample after addition of urea. Increase in AI by 15% or more was considered significant.

*** – as in Table 1.

к праймирующему и бустирующему вирусам оказались достоверно выше у праймированных волонтеров по сравнению с непраймированными. Это касалось СГТ вируснейтрализующих антител к вирусу А (H5N2) – таблица 1, а также сывороточных IgG антител к вирусу А (H5N1) – таблица 3.

Второй факт – по данным всех тестов праймирование людей ЖГВ H5N2 способствовало резкому ускорению (Д7) и усилению (Д28, Д56) продукции антител. Об этом свидетельствуют сравнительные сведения о динамике СГТ антител в опытной и контрольной группах волонтеров (табл. 1, 3). Бустированный иммунный ответ, выраженный в увеличении числа конверсий антител, наблюдался не только к вакцинному вирусу А (H5N1), но и к другим штаммам: иному клайду вируса А (H5N1) А/Индонезия/05/2005 (H5N1), к праймирующему вирусу А/индюк/Турция/05/133(H5N2) и к вирусу того же подтипа, но выделенного от водоплавающей птицы,

то есть А/утка/Потсдам/86/133(H5N2) – таблица 2. Таким образом, у праймированных волонтеров имел место бустированный гуморальный иммунный ответ и ко всем изученным гетерологичным штаммам с общим вакцинным вирусом гемагглютинином Н5. Повторная иммунизация ИГВ H5N1 праймированных лиц, в отличие от непраймированных, весьма слабо или совсем не усиливала продукцию всех типов антител – таблицы 1, 3.

Третий факт – наличие диссонанса между довольно слабым иммунным ответом (РТГА и РМН) волонтеров на праймирование ЖГВ H5N2 в 2012 г. и очень сильным бустирующим эффектом в продукции этих антител на прививку ИГВ H5N1 в 2014 г. (табл. 1 и 2). Проведенный дополнительный анализ показал полное отсутствие связи между иммунными ответами на праймирующий вирус А (H5N2) и бустирующий вирус А (H5N1). Так, по данным РТГА, из 8 волонтеров с конверсиями антител на ЖГВ H5N2 в 2012 г., от-

ветили в 2014 г. конверсиями антител на двойную прививку ИГВ H5N1 7 человек (85,5%), а из 11 лиц с отсутствием иммунных реакций на ЖГВ H5N2 у 8 (72,2%) наблюдались конверсии антител на ИГВ H5N1 в 2014 г. ($p > 0,05$). В отношении вируснейтрализующих антител получены аналогичные результаты: соответственно, 9 из 9 волонтеров (100%) и 9 из 10 волонтеров (90%) – $p > 0,05$.

Таблица 4 содержит сведения об avidности сывороточных IgA- и IgG-антител у тех же праймированных и непраймированных волонтеров. Эти результаты свидетельствуют, что праймирование ЖГВ H5N2 активнее повышало avidность обоих классов антител к вакцинному вирусу А (H5N1).

В отличие от данных о гуморальном иммунном ответе праймированных и непраймированных лиц, средние арифметические поствакцинальные (D28) уровни CD8⁺, CD8⁺Tcm и CD8⁺Tem T-клеток иммунологической памяти к вакцинному вирусу А(H5N1) у этих групп людей не отличались: соответственно, 2,22 и 2,05% для CD8⁺; 1,79 и 1,48% для CD8⁺Tcm и 3,82 и 3,83% для CD8⁺Tem ($p > 0,05$). Однако, такие отличия отмечены в предвакцинальных уровнях (D0): соответственно, CD8⁺ – 2,49 и 1,30 ($p < 0,01$) CD8⁺Tcm – 1,44 и 0,86 ($p < 0,05$) и CD8⁺Tem – 3,05 и 2,23 ($p < 0,01$).

Обсуждение

Целью любой вакцинации является индукция у людей долговременной иммунологической памяти. Эту же цель преследует и комбинационная вакцинация – образование пулов долгоживущих Т- и В-клеток памяти к бустирующему вирусу с помощью предварительного введения праймирующей вакцины [15].

В настоящей работе способность праймирующей ЖГВ H5N2 индуцировать иммунологическую память к бустирующей ИГВ H5N1 оценивали по ее пяти классическим характеристикам, а именно: скорость формирования – по состоянию иммунитета на раннем сроке (D7) после прививки ИГВ H5N1; интенсивность ее формирования – по уровню иммунитета после первой (D28) и второй (D56) прививок; продолжительность сохранения – по состоянию иммунитета через 1,5 года после праймирования (D0) и по количественным характеристикам иммунитета у праймированных волонтеров после вакцинации, по сравнению с непраймированными (D28 и D56); широта спектра антителообразования – по выявлению антител к гетерологичным вирусам; функциональная активность антител – по показателям avidности.

Обнаружено, что в предвакцинальный период (D0) у волонтеров, праймированных 1,5 года назад ЖГВ H5N2, ряд количественных параметров иммунитета к вирусам А(H5N1) и/или А(H5N2), оказались достоверно выше, чем у непраймированных лиц (табл. 1, 3). Кроме того, по неприведенным в настоящей статье нашим данным, перед вакцинацией ИГВ H5N1 у первых СТГ сывороточных антител к консервативному участку гемагглютинаина (Stalk-домену) вакцинного вируса А (H5N1) был в 2,1 раза выше, чем у вторых. Данные антитела участвуют в нейтрализации вируса гриппа [13]. Все это в совокупности косвенно свидетельствует, что праймирующая прививка ЖГВ H5N2 способствовала установлению долговременной В-клеточной памяти (не менее 1,5 года) не только к гомологичному вакцинному вирусу А (H5N2), но и к гетерологичному потенциально пандемическому вирусу А (H5N1). Обращает на себя внимание факт выявления перед вакцинацией (D0) у некоторых непраймированных людей сывороточных IgA- и IgG-антител, а также цитотоксических Т-клеток иммунологической памяти, специфичных к вирусу А (H5N1). Учитывая, что эти люди не могли контактировать с птичьими вирусами, обнаруженные антитела и клетки можно отнести к перекрестнореагирующим, проявляющим комплементарность к общим для всех подтипов вируса гриппа А антигенным эпитопам. Уровень таких антител и Т-клеток поддерживается контактами (инфекция и вакцинация) с актуальными вирусами подтипов А(H1N1) и А(H3N2).

Установлено (табл. 1-3), что у волонтеров, праймированных в 2012 г. ЖГВ H5N2, даже однократная прививка ИГВ H5N1 оказывала хорошо выраженный бустирующий эффект на развитие гуморального иммунного ответа к вакцинному штамму. Он проявлялся в ускоренной (D7) и усиленной (D28) продукции всех изученных типов антител. Повторная прививка ИГВ H5N1 оказывала либо слабый эффект, либо он вообще отсутствовал. Это свидетельствует о достаточности однократной вакцинации при использовании ИГВ H5N1 в качестве бустирующего препарата. По данным американских авторов, праймирование взрослых людей ЖГВ H5N1 также резко усилило продукцию антигемагглютинирующий (РТГА) и вируснейтрализующих (РМН) антител на отдаленную (через 5 лет) ревакцинацию ИГВ H5N1 [18].

Показано (табл. 1, 2), что бустирующий эффект ИГВ H5N1 у праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров распространился не только на антителогенез к гомологичному вакцинному вирусу

А (Н5N1), но и ко всем гетерологичным вирусам с гемагглютинином Н5. Полученные сведения о развитии кроссреактивного иммунного ответа расширяют тактические возможности применения комбинационных схем вакцинации против потенциально пандемических птичьих вирусов гриппа А. Ранее американскими учеными аналогичный кроссреактивный эффект был обнаружен у волонтеров в комбинационной системе праймирующая адьювантная ИГВ Н5N3 – бустирующая субвирионная ИГВ Н5N1 [10], а также в форме бустирования иммунного ответа к разным клэйдам вируса А Н5N1 с помощью праймирования рекомбинантной вакциной с гемагглютинином Н5 [14].

Главным в применении комбинационной стратегии вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А является вопрос об оценке способности праймирующей вакцины успешно индуцировать долговременную В-клеточную иммунологическую память. Если судить об успешности «закладки» в 2012 г. иммунологической памяти по количественным параметрам продукции антигемагглютинирующих (РТГА) или вируснейтрализующих (РМН) антител к праймирующему вирусу А(Н5N2), то можно прийти к неправильному выводу о слабости развития этого процесса (табл. 1, 2). Однако мощный бустирующий эффект, зафиксированный в 2014 г. даже у лиц с отсутствием конверсий антител на праймирование, полностью опровергает этот вывод. На самом деле формирование В-клеточной памяти на праймирование ЖГВ Н5N2 было вполне успешным, поскольку по совокупным данным всех иммунологических тестов (РТГА, РМН, ИФА – сывороточные и локальные IgА антитела, вируснейтрализующие Т-клетки памяти) 18 из 19 волонтеров (95%) ответили на ЖГВ тем или иным типом иммунной реакции. Это свидетельствует, что по отдельности РТГА (официально регламентированный тест для оценки иммуногенности гриппозных вакцин) и РМН (наиболее распространенный нерегламентированный тест) не отражают истинную картину формирования у людей В-клеточной иммунологической памяти – одного из важнейших звеньев адаптивного иммунитета. Для этого необходимо ориентироваться на совокупные данные об иммунных ответах на ЖГВ, полученные при анализе разных факторов иммунной защиты: сывороточных и локальных антител, цитотоксических и хелперных Т-клеток иммунологической памяти. Такой подход успешно апробирован нами при оценке иммуногенности отечествен-

ной ЖГВ против других потенциально пандемических вирусов гриппа А [6, 7].

Авидность антител отражает созревание В-клеточной иммунологической памяти к инфекционным агентам. Ранее американскими учеными было показано, что праймирование людей ЖГВ Н5N1 приводит к усилению продукции высокоавидных сывороточных антител к вакцинному штамму бустирующей ИГВ Н5N1 [18]. По нашим данным, иммунизация людей сезонными ЖГВ, ЖГВ A/pdm 2009 (H1N1) и ЖГВ Н5N2 также повышала авидность локальных IgА-антител [1, 2]. Результаты настоящего исследования (табл. 4) свидетельствуют, что праймирование ЖГВ Н5N2 приводило к повышению авидности сывороточных IgА- и IgG-антител к вакцинному штамму ИГВ А(Н5N1). Это подтверждает собственные данные о более низкой способности инактивированных гриппозных вакцин, по сравнению с живыми вакцинами, индуцировать высокоавидные сывороточные антитела [5].

Анализ развития Т-клеточного иммунного ответа на ИГВ Н5N1 у праймированных и непраймированных ЖГВ Н5N2 волонтеров показал парадоксальный эффект. По аналогии с гуморальным иммунным ответом мы ожидали, что поствакцинальная продукция вирусспецифических CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти у праймированных будет выше, чем у непраймированных. Однако этого не наблюдалось. Можно предположить, что торможение CD8⁺Т-клеточного иммунного ответа у праймированных волонтеров носит либо компенсаторный характер вследствие резко усиленного гуморального иммунного ответа, либо оно связано с более высоким исходным уровнем этих клеток у праймированных лиц в Д0. Так, статистический анализ полученных результатов показал высокие значения коэффициента Спирмена (от -0,71 до -0,84), отражающие существование четко выраженной обратной зависимости между уровнями CD8⁺, CD8⁺Tcm и CD8⁺Tem Т-клеток перед вакцинацией и достоверным (в 20 и более раз) конверсиями этих клеток после прививки ИГВ Н5N1.

В работе американских авторов [15] совершенно справедливо поставлен вопрос о выборе оптимальных сроков между введением праймирующих и бустирующих вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа А. Это важно с точки зрения развития полноценной поствакцинальной иммунологической памяти на праймирование. Показано, что короткий период (1-3 месяца) между праймирующей и бустирующей прививками ИГВ не вызывал усиление гуморального иммунного ответа на по-

следнюю [9]. В исследовании по праймированию людей ЖГВ H5N1 с последующим через 5 лет бустированием ИГВ H5N1 приведены убедительные доказательства сохранения поствакцинальной В-клеточной иммунологической памяти к праймирующему вирусу не менее этого срока [18]. Эти данные свидетельствуют, что в стратегическом плане даже очень длительный интервал между праймированием и бустированием вряд ли может отразиться на защитной функции приобретенной В-клеточной памяти. Однако вопрос о сроках существенен с точки зрения тактики вакцинации по следующим соображениям. Проводить массовую вакцинацию людей против потенциально пандемических вирусов гриппа А без возникновения угрожающей ситуации с экономической точки зрения не рентабельно. Обычно между возникновением такой ситуации и полноценным развитием пандемии нового серотипа вируса гриппа А проходит не менее 1-1,5 лет. За этот период времени можно успеть праймировать население ЖГВ в ближайший сезон вакцинации (сентябрь – ноябрь), а на следующий сезон бустировать ИГВ. Поэтому мы считаем выбранный нами период в 1,5 года оптимальным.

Заключение

Обобщая данные, можно отметить следующее:

Двухкратная прививка ИГВ H5N1 непримированных лиц слабо стимулировала гуморальный

иммунный ответ к вакцинному штамму. Отдаленное (1,5 года назад) праймирование людей ЖГВ H5N2 резко ускоряло и усиливало продукцию сывороточных антител, даже после однократной вакцинации ИГВ H5N1. Это касалось антител как к вакцинному вирусу А H5N1, так и к гетерологичным штаммам с тем же гемагглютинином. У праймированных лиц IgA- и IgG-антитела к вакцинному штамму обладали более высокой авидностью по сравнению с непримированными. Все эти факты свидетельствуют о том, что отдаленное праймирование людей отечественной ЖГВ H5N2 формирует долговременную В-клеточную иммунологическую память к потенциально пандемическому вирусу А (H5N1). В отдельности данные РТГА и РМН об иммуногенности праймирующей ЖГВ H5N2 не отражали ее истинные свойства по «закладке» В-клеточной памяти. Для правильной оценки этого качества ЖГВ требуется учет совокупных данных комплексного иммунологического обследования прививаемых людей (РТГА+РМН+ИФА+Т-клетки памяти). Оптимальным сроком между праймированием ЖГВ и бустированием ИГВ является 15-18 месяцев. В целом полученные данные обосновывают новое направление в применении ЖГВ для защиты от потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Список литературы / References

1. Дони́на С.А., Кореньков Д.А., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Оценка авидности локальных IgA-антител у людей, привитых живой гриппозной вакциной // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 423-430. [Donina S.A., Korenkov D.A., Rudenko L.G., Naikhin A.N. Avidity evaluation of local IgA antibodies in persons immunized with live influenza vaccine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 2010, no. 4-5, pp. 423-430. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-423-430.
2. Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный гуморальный иммунный ответ у больных гриппом людей и лиц, привитых сезонными, пандемической и потенциально пандемической живыми гриппозными вакцинами // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local antibody immune responses in influenza patients and persons vaccinated with seasonal, pre-pandemic, and pandemic live attenuated influenza vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
3. Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Ерофеева М.К., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Использование метода оценки поствакцинальной секреции антител В-лимфоцитами *in vitro* для характеристики иммуногенности в клинических испытаниях резервных гриппозных вакцин А (H5N1) и А (H5N2) // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 129-138. [Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Erofeeva M.K., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Application of method based on *in vitro* antibody quantification in PBMC supernatant samples for evaluation of A (H5N1) and A (H5N2) potentially pandemic influenza vaccines immunogenicity in clinical

trials. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 129-138. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138.

4. Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Обнаружение у людей кроссреактивных антител и Т-клеток иммунологической памяти к антропонозным и зоонозным подтипам вируса гриппа А // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 347-358. [Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Crossreactive antibodies and memory T cells to human and zoonotic influenza A viruses in volunteers. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 347-358. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-347-358.

5. Найхин А.Н., Артемьева С.А., Босак Л.В., Каторгина Л.Г. Значение функциональной активности антител в противогриппозном иммунитете // Вестник РАМН, 1995. № 9. С. 32-36. [Naykhin A.N., Artemyeva S.A., Bosak L.V. The value of the functional activity of antibodies in anti-influenza immunity. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 1995, no. 9, pp. 32-36. (In Russ.)]

6. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Гомологичный и гетерологичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые реассортантные гриппозные вакцины А(H5N2) и А(H7N3) // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 59-70. [Naykhin A.N., Donina S.A., Losev I.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Stukova M.A., Erofeeva M.K., Konshina O.S., Smolonogina T.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. Homological and heterological antibody and T-cell immune responses to live attenuated influenza vaccine A (H5N2) and A (H7N3). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 59-70. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-59-70.

7. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Суворова М.А., Руденко Л.Г. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/ Калифорния/ 07/ 2009 (H1N1) – А(H1N1)pdm2009 // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, №2. С. 38-42. [Naykhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Suvorova M.A., Rudenko L.G. Humoral and Cell-mediated Immune Responses in Humans to the A/California/ 07/ 2009 (H1N1) Virus, A(H1N1)pdm2009. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 2, pp. 38-42. (In Russ.)]

8. Chang H.S., Sack D.A. Development of a novel *in vitro* assay (ALS assay) for evaluation of vaccine-induced antibody secretion from circulating mucosal lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, Vol. 8, no. 3, pp. 482-488.

9. Choi Y.S., Baek Y.H., Kang W., Nam S.J., Lee J., You S., Chang D.Y., Youn J.C., Choi Y.K., Shin E.C. Reduced antibody responses to the pandemic (H1N1) 2009 vaccine after recent seasonal influenza vaccination. *Clinical Vaccine Immunology*, 2011, Vol. 18, no. 9, pp. 1519-1523.

10. Goji N.A., Nolan C., Hill H. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J. Infect Dis.*, 2008, Vol. 198, no. 5, pp. 635-641.

11. He X.S., Holmes T.H., Zhang C. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 23, pp. 11756-11766.

12. He X.S., Sasaki S., Narvaez C.F. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 2011, Vol. 365, no. 1-2, pp. 67-75.

13. Krammer F., Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current Opinion Virology*, 2013, Vol. 3, no. 5, pp. 521-530.

14. Ledgerwood J.E., Wei C.J., Hu Z. DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials. *Lancet Infect. Dis.*, 2011, Vol. 11, no. 12, pp. 916-924.

15. Luke C.J., Subbarao K. Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines*, 2014, Vol. 13, no. 7, pp. 873-883.

16. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 2001, Vol. 357, no. 9272, pp. 1937-1943.

17. Rowe T, Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, Vol 37, no. 4, pp. 937-943.
18. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 209, no. 12, pp. 1860-1869.
19. WHO global action plan vaccine supple for influenza vaccine. 2006, Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. HO/ODS/EPR/GIP/2006.1.

Авторы:

Лосев И.В. — научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Донина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Петухова Г.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кореньков Д.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ерофеева М.К. — д.м.н., заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Стукова М.А. — ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Найхин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Korenkov D.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Erofeeva M.K., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Trials of Novel Antiviral Protective Remedies, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Stukova M.A., Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Naykhin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.12.2016

Отправлена на доработку 13.12.2016

Принята к печати 29.12.2016

Received 01.12.2016

Revision received 13.12.2016

Accepted 29.12.2016